

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



**Petra Dušková**

Interakce gastrointestinálního traktu a centrální nervové soustavy:  
Fyziologické mechanismy a patologie

Interaction between gastrointestinal tract and central nervous system:  
Mechanisms and pathology

**Bakalářská práce**

Školitel: PhDr. RNDr. Tereza Nekovářová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Karel Valeš, Ph.D.

**Praha, 2017**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. května 2017

.....  
Petra Dušková

## **Abstrakt**

Práce shrnuje relevantní poznatky o bakteriálním ekosystému lidského střeva s důrazem na komunikaci mikrobiomu s makroorganismem. Popisuje fyziologické mechanismy vzájemného ovlivňování systémů tak vzdálených, jako je střevo a mozek. Za modelový příklad pro popis těchto mechanismů volí duševní a neurovývojové poruchy, zejména autismus.

Střevní mikroflóra ovlivňuje fungování a vývoj CNS řadou způsobů. Na základě komunikace mikrobioty se střevním epitelem se zvyšuje nebo snižuje propustnost střev. Bakterie produkují neurotransmitery a jejich prekurzory, mastné kyseliny a mnoho dalších potenciálně neuroaktivních látek, které se na základě propustnosti střevní bariéry v různé míře dostávají do krve. Při narušení komunikace mikroekosystému s hostitelem může vznikat zánět a zvýší se produkce cytokinů. Ty mohou rozvolňovat hematoencefalickou bariéru a zvýšit průnik škodlivých látek do mozku.

Tato bakalářská práce si klade za cíl shrnout a logicky utřídit aktuální poznatky a popsat nejasné otázky ve vztahu mezi skladbou mikrobiomu a duševním zdravím. Závěrem této práce je, že bakteriální mikrobiom střev ovlivňuje fungování mozku ve zdraví i v nemoci. Destabilizace mikrobiomu zhoršuje projevy celé řady neuropsychiatrických onemocnění. V některých případech se dysbióza spolu s dalšími faktory podílí na samotném vzniku nemoci.

**Klíčová slova:** bakteriální mikrobiom, duševní poruchy, autismus, imunita, neurochemie

## **Abstract**

This work summarizes relevant information about bacterial ecosystem of human intestine with an emphasis on microbiome-host communication. I describe physiological mechanisms influencing so as distant as the intestine and the brain. Neuropsychiatric and neurodevelopmental disorders, especially autism, are used as a model.

Human gut microbiome influences function and development of the brain in many ways. The intestinal barrier permeability increases and decreases by the consequences of microbes contact with epithelium. Many bacterial species produce neuroactive molecules, neurotransmitters, their precursors and fatty acids. These molecules enter the bloodstream depending on intestinal barrier tightness. Disruption of microecosystem and host communication may cause pathological inflammations and increase cytokine production. Cytokines are able to weaken the blood-brain barrier and enable penetration of potentially harmful substances into the brain.

The main goal of this bachelor thesis is to summarize and logically organise current information and point out important questions about the relations between the microbiome composition and mental health. In conclusion, bacterial microbiome influences brain functions in health and disease. Ecological destabilisation of microbiome is one of the factors worsening or even directly causing neuropsychiatric illness.

**Key words:** bacterial microbiome, psychiatric illnesses, autism, immunity, neurochemistry

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své školitelce PhDr. RNDr. Tereze Nekovářové, Ph.D. a konzultantovi RNDr. Karlu Valešovi, Ph.D. za cenné rady a podporu při psaní mé bakalářské práce a za významné rozšíření mých obzorů v oblasti správného psaní odborných textů. Dále bych chtěla poděkovat rodičům za trpělivost, s jakou mě podporovali ve studiu, asistentce pro studenty se speciálními potřebami Tereze Cachové za doprovod na konzultace a pomoc s orientací ve formálních náležitostech, studijnímu oddělení Přírodovědecké fakulty UK za trpělivost při řešení a vysvětlování neobvyklých otázek, svým přátelům a kolegům za pomoc s plněním pracovních povinností v době psaní této bakalářské práce. A také všem ostatním, kdo věřili, že práci zdárně dokončím.

## **Seznam zkratek**

**ACTH** – adenokortikotropní hormon  
**ADHD** – attention deficit hyperactivity disorder  
**ASD** – autism spectrum disorder, porucha autistického spektra  
**CARS** – children autism rating scale  
**CNS** – centrální nervový systém  
**CRP** – C-reaktivní protein  
**DMN** – default mode network  
**DSS** – Dextran Sulfate Sodium  
**F/B** – poměr Firmicutes : Bacteroidetes  
**GI** – gastrointestinální  
**GIT** – gastrointestinální trakt  
**HDAC** – histone deacetylase  
**IBS** – irritable bowel syndrome, syndrom dráždivého tračníku  
**IS** – imunitní systém  
**LPS** – lipopolysacharid  
**MDD** – major depressive disorder, velká deprese  
**MIA** – maternal immune activation, animální model duševních poruch  
**MK** – mastná kyselina  
**NCGS** – non-coeliac gluten sensitivity  
**NMK** – nenasycená mastná kyselina  
**OCD** – obsessive-compulsive disorder, obsedantně kompulzivní porucha  
**PANDAS** – Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infections  
**PAS** – porucha autistického spektra  
**SCFA** – short chain fatty acid – mastná kyselina s krátkým řetězcem  
**VPA** – valproic acid, valproát

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Duševní poruchy se vztahem k mikrobiomu .....	2
2.1. Duševní onemocnění nejčastěji studovaná v souvislosti s mikrobiomem .....	2
2.2. Autismus jako modelový příklad komunikace mikrobiomu a mozku.....	3
2.2.1. Behaviorální projevy a etiologie autismu .....	3
2.2.2. Gastrointestinální komorbidita u autismu .....	4
2.3. Mozek člověka jako síť .....	5
2.4. Autismus – porucha dlouhých nervových spojů.....	6
3. Trávicí soustava člověka a mikrobiom.....	6
3.1. Co je střevo a jaké organismy s ním interagují.....	6
3.2. Stavba a funkce střevní stěny.....	7
3.3. Metody zkoumání mikrobiomu střev .....	8
3.3.1. Zjišťování přítomných druhů .....	8
3.4. Zdravý mikrobiom střev – nejběžnější mutualistické/komenzální taxony a jejich zastoupení ....	9
3.5. Příčiny interindividuální variability mikrobiomu .....	9
3.5.1. Změny v závislosti na věku jedince.....	10
3.5.2. Variabilita zdravého mikrobiomu v závislosti na lokalitě a dietě .....	11
4. Dysbióza, její vznik a druhové změny .....	12
4.1. Rizikové environmentální faktory vzniku dysbiózy během raného vývoje .....	12
4.2. Rizikové faktory pro mikrobiom dospělého typu .....	13
4.3. Široké spektrum druhů: hendikep nebo výhra? .....	14
4.4. Poměr Bacteroidetes/Firmicutes – marker dysbiózy s velkou variabilitou .....	14
4.5. Změny v zastoupení komenzálních taxonů při dysbióze .....	14
4.6. Patogenní druhy bakterií u neuropsychiatrických poruch .....	16
4.6.1. Rod Clostridium – producent toxinů .....	17
4.6.2. Rod Desulfovibrio – producent sulfanu.....	18
4.6.3. Rod Porphyromonas – bakterie narušující střevní stěnu .....	18
5. Fyziologické mechanismy, kterými střevní bakterie ovlivňují mozek .....	18
5.1. Narušení epiteliální a hematoencefalické bariéry.....	19
5.2. Chemická komunikace skrze narušenou bariéru.....	19
5.2.1. Butyrát, propionát a další MK s krátkým řetězcem .....	19
5.2.2. Glutamát a další volné aminokyseliny.....	21
5.2.3. GABA a další neuroaktivní látky .....	22
5.2.4. Indolové a fenolové deriváty, exorfiny.....	22
5.3. Komunikace přes imunitní systém .....	23

5.4. Dysbióza, aktivace imunitního systému a oxidativní stres .....	25
5.5. Osa hypothalamus – hypofýza – nadledvinky a její změny u dysbiózy .....	25
5.6. Nervus vagus, vagová signalizace a retrogradní transport.....	26
5.7. Výživa a mikrobiom .....	27
6. Diskuze.....	28
6.1. Rozpory ve výsledcích jednotlivých studií.....	28
6.2. Antibiotika nemusí narušovat jen střevní mikrobiom.....	29
6.3. Další organismy ve střevě a další onemocnění.....	29
6.4. Závěrem: Je autismus plně vysvětlitelný narušením mikrobiomu? .....	29

## 1. Úvod

Mikrobiom zažívacího traktu člověka je složitý ekosystém. Počet bakteriálních buněk ve střevě přesahuje počet lidských buněk v celém organismu až desetinásobně [1] a počet genů dosahuje více než stonásobku lidských eukaryotních genů [2]. Lidské střevo hostí více než tisíc druhů organismů [1], které každodenně přicházejí do styku a složitě komunikují s buňkami střevního epitelu a imunitního systému. Ekologické vztahy mezi nesmírným počtem bakteriálních, ale i eukaryotních druhů, jsou pravděpodobně složitější, než nekomplexnější deštný prales.

Mikrobiomy různých osob se navíc vzájemně liší v zastoupení jednotlivých druhů i v celkové diverzitě. Lze vysledovat podobnosti střevních ekosystémů v rámci rodin, geograficky oddělených populací, či skupin sdílejících podobné dietní návyky [3].

V optimálním případě jsou mikrobi žijící v našem střevě na tento způsob života dobře adaptovány. Komunikují s „toll like“ receptory našich buněk (receptory imunitních buněk, navazující specifické antigeny cizorodých organismů a regulující imunitní odpověď B a T lymfocytů), formují chování našeho imunitního systému, který je v ideálním případě rozeznává jako nepatogenní a neútočí proti nim. Regulační T-lymfocyty ve střevní sliznici mají receptory pro mastné kyseliny s krátkým řetězcem [4]. Tyto MK jsou produkovány fermentujícími bakteriemi, soustavně modulujícími imunitní systém hostitele [3].

K dysbióze a potenciálně škodlivému vlivu střevního ekosystému na mozek dochází pravděpodobně souhrou více příčin. Roli hraje nepřeborné množství genetických mechanismů, od genů pro tvorbu membránových proteinů a těsných spojení až po jednotlivé složky imunitního systému. Obdobný rozsah by měl i výčet environmentálních příčin – antibiotika, infekce, nedostatek esenciálních živin, nutriční hodnoty potravy, psychosociální stres a další. Vzhledem k tomu, že většinová populace vážnými poruchami zdraví netrpí, lze o systému GIT – CNS uvažovat jako o poměrně robustním, s vysokou mírou redundance, kde narušení jednoho z jmenovaných parametrů nemusí nutně rovnováhu rozbít. K ustavení a udržování patologického stavu je obvykle zapotřebí souhra více činitelů.

Pokud se skladba mikrobiomu naruší, vznikne nerovnováha mezi počty jednotlivých druhů a rodů nebo dojde k oslabení ekologicky klíčových taxonů. V nastalém chaosu, kdy imunitní systém nedostává správné informace, může vzniknout záněť. Narušení střevní stěny vede k zvýšené translokaci bakteriálních lipopolysacharidů (LPS) do krevního oběhu, kde vyvolávají zánětlivou reakci imunitního systému. Nepatrná hladina LPS se nachází v krvi každého člověka, přičemž hlavním zdrojem jsou právě střevní bakterie. Osoby s dysbiózou či narušenou střevní stěnou mají často hladinu LPS v krvi zvýšenou, což je provázeno zvýšením prozánětlivých cytokinů. Zvýšená hladina LPS byla zjištěna v krvi pacientů s chronickými neuropsychiatrickými poruchami [5], stejně jako změny v expresi proteinů tvořících bariéru střevní sliznice [6].

Prozánětlivé cytokiny, ale i běžné produkty střeva, jako jsou mastné kyseliny, a potenciální neuromodulátory, vstupují při dysbióze ve zvýšené míře do krevního řečiště, přičemž mohou přispívat k narušení hematoencefalické bariéry [7]. Při dysbióze se do krevního oběhu nedostávají jen běžné produkty střeva a kmenových bakterií. V narušeném ekosystému se daří i patogenním druhům, které by jinak byly konkurencí vytlačeny. Některé patogenní druhy tvoří toxiny nebo potenciální neuromodulátory, například indolové a fenolové deriváty [1],[8],[9],[10]. Cytokiny rozvolní hematoencefalickou bariéru a neuroaktivní molekuly se mohou dostat do mozku, kde přímo interferují s jeho vývojem a fungováním.

Dysbióza ovlivňuje CNS i nepřímo, prostřednictvím výživy organismu, aktivace imunitního systému nebo stimulací stresové odpovědi přes enterický nervový systém. Nervus vagus vysílá při



dysbióze signály, které v mozku spouštějí stresovou reakci a uvolňují stresové hormony. Sám může některé potenciálně škodlivé látky do mozku retrográdním transportem přepravovat [11], [12]. Střevní mikroflóra ochuzená o důležité druhy hůře získává živiny z potravy, což se může projevit nedostatkem esenciálních látek. Ten pak pomáhá patologický stav prohlubovat, a je těžké určit příčinu a následek. Například deficit vitamínu D narušuje kromě mnoha dalších procesů také rovnováhu střevní mikroflóry, která pak neprodukuje dostatek vitamínu B12. Oba vitamíny jsou pro fungování mozku a imunitního systému nezbytné [13].

Jak jsme již uvedli výše, narušení mikrobiomu střev aktivuje imunitní systém a vyvolává zánětlivou reakci. Aktivovaný imunitní systém produkuje množství volných radikálů. Ty prohlubují deficit antioxidantů, často již přítomný kvůli nedostatku esenciálních látek. Snížená antioxidační kapacita a/nebo zvýšené oxidační procesy vedou k oxidativnímu stresu a poškození struktur organismu. Velmi náchylné jsou z tohoto hlediska fosfolipidové membrány. Mozek obsahuje extrémní množství membránových struktur, navíc je metabolicky hodně aktivní. Proto je jako orgán snadno zranitelný oxidativním stresem. Znamky oxidačního stresu byly prokázány u depresí [14], schizofrenie [15] i autismu [16]. U těchto nemocí byl zároveň zjištěn statisticky vyšší počet gastrointestinálních poruch a častější odchylky v druhové skladbě mikrobiomu střev.

Mechanismů, jak narušený mikrobiom přispívá k psychiatrickým symptomům, je mnoho. Nejvýznamnější z nich budou představeny v páté kapitole.

## **2. Duševní poruchy se vztahem k mikrobiomu**

### **2.1. Duševní onemocnění nejčastěji studovaná v souvislosti s mikrobiomem**

Největší pozornosti se střevním symbiontům začalo dostávat s rozmachem molekulárně taxonomických metod. Důvod je prostý – v běžných podmínkách lze kultivovat jen zanedbatelný počet ze zhruba 1000 druhů obývajících lidské útroby, a je to práce zdoluhavá a náročná. Díky rozvoji moderních analytických metod a počítačových databází dnes můžeme studovat mikroekosystém střev s rozlišením jednotlivých taxonů a jejich procentuálního zastoupení, objevovat vztahy mezi bakteriemi, viry, bakteriofágy i organismy poněkud většími, jako jsou kvasinky, prvoci, mnohobuněční parazité a samotný lidský hostitel.

Ve své práci se zaměřím na neuropsychiatrická onemocnění a mechanismy, jakými k nim přispívají především bakterie. Představíme si nyní stručně neuropsychiatrické poruchy, s nimiž se v průběhu práce budeme setkávat.

Prvním tématem, které nás napadne v souvislosti se zažívacím traktem a chováním, jsou poruchy příjmu potravy - přejídání, obezita, anorexie a bulimie, nezdravé stravovací návyky. Člověk si vzhledem k bohaté inervaci zažívacího traktu snadno představí, že narušené zpracování potravy vlivem nevhodné střevní mikroflóry může změnit potravní chování a preference. Dalším mechanismem, jakým mikroflóra ovlivňuje tělesnou hmotnost může být její schopnost zpracovávat živiny, ale i působit na hormonálně řízené hospodaření organismu s energií [17]. Myši, u nichž byla vysokokalorickou stravou vyvolána obezita, prodělaly v průběhu podávání této stravy změnu druhové skladby mikroflóry, která poté snáze získávala z potravy energii [18]. V páté kapitole na potravní chování versus mikrobiom ještě několikrát narazíme.

Poruchy nálad jsou dalším možným cílem našeho zkoumání, protože je známo, že bakterie produkují neurotransmitery [19] a jejich prekursorů, které jsou vstřebávány do krevního oběhu. I dalšími cestami mohou bakterie náladu ovlivňovat.

O mikrobiomu depresivních pacientů existuje enormní množství publikací a review. Nejvíce prací se týká tzv. velké deprese („major depressive disorder, MDD“), existují však i výzkumy mikrobiomu u pacientů se sezónní depresivní poruchou nebo bipolární poruchou. Výzkumy byly provedeny na velkých souborech pacientů a jsou dobře statisticky zpracované. Používá se většinou standardizovaná metodika a proto existují i kvalitně zpracované metaanalýzy změn, které při depresi v organismu nastávají. Vzhledem k enormnímu množství publikací nás téma deprese bude provázet v průběhu celé práce. Výhodou tématu je i to, že většina studií byla provedena na dospělých pacientech, a tvoří tak paralelu k mechanismům neurovývojových poruch u dětí.

Úzkostné poruchy sensu stricto. Abnormální chování naznačující úzkost (*anxiety-like behavior*) vykazují myši, chované ve sterilním prostředí bez bakterií (*germ-free*) a lze jej zmírnit podáváním bakterie *Lactobacillus plantarum* [20]. *L. plantarum* má gen pro syntézu inhibičního neurotransmiteru GABA [19] a acetylcholinu [21]. I u lidských pacientů je úzkost jeden z nejnáze ovlivnitelných symptomů pomocí modulace mikrobiomu. Proto se úzkostí budeme zabývat v hlavní části, zejména úzkostným a kompenzačním chováním přidruženým k diagnóze autismu.

Psychózy a schizofrenní okruh onemocnění je fyziologicky heterogenní skupina onemocnění diagnostikovaných na základě nestandardního chování a myšlení. Vyznačují se obvykle přítomností bludů nebo halucinací v mysli pacienta, ale také sociální stažeností a abnormálním prožíváním emocí. Studií o změnách mikrobiomu u onemocnění z okruhu psychóz bylo publikováno velké množství. Jelikož prezentují širokou paletu rozdílných až protichůdných výsledků, podíváme se na ně ve fyziologické části této práce blíže a využijeme srovnání s neurovývojovými poruchami, zejména s autismem.

## **2.2. Autismus jako modelový příklad komunikace mikrobiomu a mozku**

Nejvíce publikací na téma GIT jako spouštěče duševních poruch bylo sepsáno o autismu. Lidé s autismem mají od raného dětství potíže se smyslovou integrací, porozuměním okolnímu světu a přizpůsobením okolnostem. Nejvýrazněji se deficit projevuje v sociální komunikaci, která vyžaduje velkou flexibilitu, integraci mnoha nenápadných vjemů ve smysluplný celek a vnímání vlastních i cizích reakcí současně.

Dle současných medicínských kritérií je autismus vnímán jako spektrum poruch diagnostikovaných na základě projevů chování. Tíže a forma projevů se mezi jednotlivci výrazně liší, proto hovoříme o spektru. V této práci budeme používat termín *autismus* nebo *poruchy autistického spektra (PAS)* coby synonyma. Oba pojmy (*autism*, *ASD*) se v odborné literatuře týkající se mikrobiomu běžně používají.

### **2.2.1. Behaviorální projevy a etiologie autismu**

Autismus se projevuje triádou postižení v oblastech sociální porozumění, komunikace a představitivosti. Nastupuje vždy v raném dětství. Dané schopnosti se vyvíjejí od začátku pomaleji než jiné kognitivní domény přiměřené věku (právě nevyrovnaný vývojový profil, kde deficit v sociálních schopnostech je hlubší než deficit v obecné inteligenci je základem pro diagnózu autismu – deficit inteligence přitom může a nemusí být přítomen).

V až 41% případů nastává u dětí do 3 let věku tzv. autistický regres [10], [22], [23] – ztráta již osvojených řečových, sociálních nebo motorických dovedností u dítěte, která se do té doby vyvíjelo běžným způsobem. Někdy nastává regres bezprostředně po větší zátěži imunitního systému, jakou může být očkování, horečnaté onemocnění, infekce léčená antibiotiky nebo přechod na pevnou stravu. Otázka,

zda je tato fyziologická zátěž příčinou autismu u predisponovaných jedinců, pouze spouštěčem neodvratného procesu, nebo shodou náhod, zůstává stále otevřená.

Nastane-li vývojový regres po třetím roce života, hovoříme o dětské dezintegrační poruše, která spadá pod PAS. Jak je možné, že běžně se vyvíjející dítě náhle ztratí schopnost vnímat a chápat okolní svět? Mezi veřejností se rošířily teorie o vlivu očkování, avšak žádný z mnoha publikovaných článků (recentně např. [24], [25]) přímou souvislost nepotvrdil.

Toto těžké neurovývojové postižení je celosvětově na vzestupu, a ačkoli se velká část nárůstu dá přičíst lepší diagnostice, ta nevysvětluje vše. Genetický základ hraje velkou roli, nikoli však absolutní (u jednovaječných dvojčat je konkordance menší než 100%, přičemž dvojčata se liší v míře postižení [26]). Jedná se o multietiotologické onemocnění. Projevy autismu se vyskytují u dobře prozkoumaných genetických poruch jako je syndrom fragilního X chromozomu, nebo Rettův syndrom (mutace MeCP2 genu). U většiny osob s autismem však genetická vyšetření žádný podobný syndrom neodhalila.

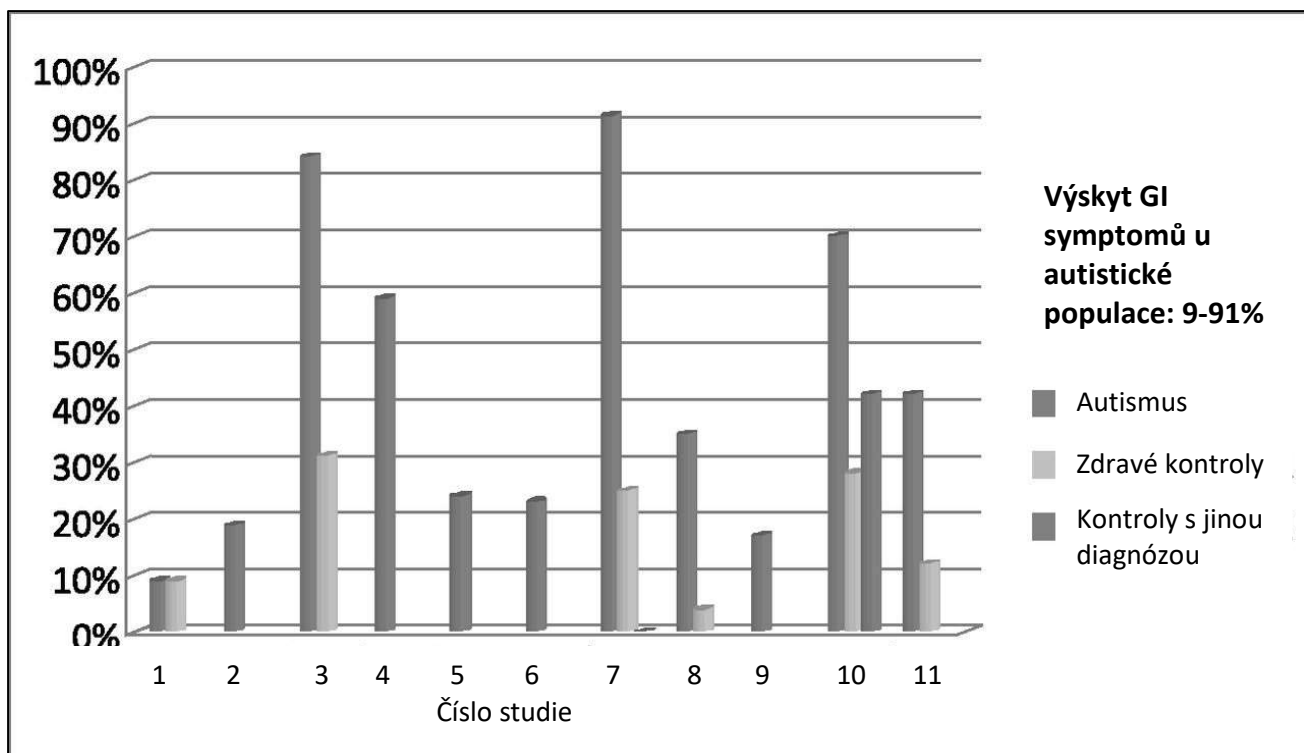
S autismem je spojováno několik stovek genů, z nichž žádný není poškozený ve všech případech. Nezanedbatelnou roli hraje vliv prostředí. Například myší modely autismu se vytvářejí podáním valproátu (VPA) nebo virového mimetika (MIA) březím samicím. Zdá se, že autismus není jedno onemocnění, dělí se podle závažnosti, ale spíše široká škála podobně se projevujících metabolických, imunopatologických, genetických a jiných postižení s manifestací v podobě narušeného neurovývoje.

### **2.2.2. Gastrointestinální komorbidity u autismu**

Uvádí se, že až 9-91% dětí, splňujících medicínská kritéria pro autismus trpí zároveň projevy gastrointestinálního dyskomfortu dle pediatrických tabulek (ROME III). Mezi nejčastější patří průjem, zácpa, bolesti břicha a plynatost [27]. U 58 dětí s autismem korelovaly GI potíže s tíží autistické symptomatiky [28]. I zde jsou však výsledky nejednoznačné a záleží pravděpodobně jak na metodice zjišťování GI symptomů, tak na studované podskupině autistické populace a na volbě kontrol. Studie 124 dětí s autismem neodhalila žádné signifikantní odlišnosti GI symptomech oproti kontrolám, které by nebylo možné vysvětlit behaviorálně. Dotazníky kromě přítomnosti symptomů hodnotily také životní styl a stravovací návyky dětí, a mírně zvýšené příznaky GI dyskomfortu korelovaly s mírou stravovacích zvláštností autistů [29].

Obrázek 1 dobře demonstruje nejednoznačnost výsledků kvantifikace gastrointestinálních symptomů. Ta může plynout z rozdílné metodiky, jelikož hodnocení závažnosti GI symptomů je poměrně subjektivní a míra pozitivních odpovědí bude záviset na formulaci dotazníku. Některé symptomy, například bolest, budou pečujícími osobami pravděpodobně podhodnoceny u těžších forem poruch komunikace. Hodnotit metodickou stránku jednotlivých studií GI komorbidit u autismu by přesahovalo rozsah této práce, proto uvádím pouze jejich grafické shrnutí vytvořené Courym a kol.. Obrázek by měl vést k zamyšlení, proč většina studií naznačuje souvislost diagnózy autismu s vyšší prevalencí GI symptomů.

Autismus v sobě zahrnuje problematiku stravování, zvládání stresu, úzkostí, rituálů a komorbidit s OCD, sickness behavior, změny smyslového vnímání a další jevy obecně související s narušením CNS. Má pevně daný věk manifestace. Původně spekulované psychologické příčiny byly jednoznačně vyvráceny. Je prokázáno, že za projevy autismu stojí změny ve struktuře a funkci mozku, nikoli výchova nebo sociální faktory.



Obr. 1: Srovnání míry GI symptomů u osob s autismem a kontrol u různých autorů. Upraveno dle Coury a kol. [30]. Ačkoli se výsledky studií liší, téměř u všech vidíme neobvykle vysokou míru gastrointestinálních potíží u osob s autismem.

Vzhledem k enormnímu množství prací popisujících všechny myslitelné mechanismy komunikace GIT a CNS, jsem si autismus vybrala jako hlavní téma práce, na němž budu narušení komunikačních drah demonstrovat.

### 2.3. Mozek člověka jako síť

Mozek integruje vjemy všech smyslů, reaguje na hormonální stav organismu a umožňuje jedinci komplexně reagovat na své okolí. Umožňuje také ukládání informací, paměť a kontinuální vnímání času. Narušení integračních procesů v mozku může vést k dezorientaci, zahlcení smyslovými vjemy bez schopnosti se v nich vyznat a adekvátně reagovat. Různé neuropsychiatrické diagnózy zahrnují různé závažné poruchy fungování CNS. U autismu je nejvýraznější porucha třídění smyslových vjemů a orientace v nich [31], [32], u mentální retardace nebo demence má mozek omezenou schopnost porozumět komplexní informaci nebo ukládat informace do paměti a následně je vyvolávat. U afektivních poruch vede narušená biochemie mozku k jednostranně zatíženému hodnocení komplexních vjemů (negativní či ohrožující vnímání událostí) nebo u psychotických onemocnění dokonce k vytváření falešných smyslových vjemů přímo v mozku.

Fungování mozku lze narušit lokálním fyzickým poškozením jednotlivých center úrazem nebo např. lézí, kdy poškození centra vyvolá narušení funkce, kterou centrum řídí (např. dobře zdokumentovaná Brocova či Wernickeho afázie, lišící se tím, zda postižený neovládá mluvidla, nebo mluvené řeči nerozumí). Mozek se tedy jeví být rozdělen na určité funkčně specifické oblasti – centra.

Ani tato idea však nefunguje úplně černobíle – jednotlivé schopnosti člověka nejsou striktně lokalizovány v prostorově izolovaných centrech nebo hemisféře (neplatí např. že by emoce byly uloženy v jedné a racionální myšlení v druhé hemisféře – k prožívání obojího používáme obě). Mozek

je velmi plastický a lokální poškození i poměrně velké části mozku nemusí napáchat velkou škodu na schopnostech člověka. Schopnost adaptace záleží na typu, místě a rychlosti vzniku poškození.

Spíše než mluvit o mozku jako o souboru izolovaných center je na místě metafora dynamické sítě, kde jednotlivé specializované oblasti neustále komunikují se svým okolím pomocí tzv. krátkých spojů (tenčí, méně myelinizované axony) a dlouhých spojů (dlouhé axony s větším průměrem, sloužící ke spojování fyzicky vzdálených center). Způsob zapojení jednotlivých center se liší podle toho, jakým úkolem se mozek zabývá. Dokonce i bez soustavné stimulace prostředím mozek produkuje specifickou synchronizovanou aktivitu i velmi vzdálených center, přičemž nejznámější z těchto tzv. endogenních sítí je *Default mode network* (DMN). V současnosti probíhá mnoho výzkumů na téma souvislosti endogenních sítí, tedy na stimulaci nezávislého propojení mozkových center, v souvislosti s neuropsychiatrickými poruchami. Nikoli funkce jednotlivých center, ale spíše způsob a efektivita jejich propojení by mohly být klíčem k pochopení duševních nemocí.

## **2.4. Autismus – porucha dlouhých nervových spojů**

Schopnosti, narušené autismem, mají jedno společné – vyžadují vysoký stupeň abstrakce, celostního vidění na úkor detailů, rychlé třídění smyslových vjemů a přepínání pozornosti – jinými slovy efektivní spolupráci fyzicky vzdálených mozkových center. Autismus je dle některých autorů poruchou vývoje sítě tzv. dlouhých nervových spojů [32]. Studie post mortem našla v mozku autistů méně dlouhých axonů [33], byly tenčí a méně myelinizované, zatímco krátké spoje v rámci jednotlivých center byly naopak zmnožené. Podobné výsledky byly publikovány mnohokrát a korelují i s funkčními abnormalitami konektivity u živých subjektů pozorované funkční magnetickou rezonancí [31], [32].

Nadprůměrné množství axonů v rámci lokálních center vysvětluje vynikající paměť některých autistů, nebo geniální schopnosti v určité oblasti zájmu. Uplatnění těchto speciálních dovedností bývá však ztíženo deficitem v propojení a integraci signálu různých center. Nedostatečná synchronizace vzdálených center působí lidem s autismem problémy v seberegulaci, přepínání pozornosti, zvládání emocí, plánování, chápání abstraktních motivací (např. pochvala, úspěch) a deficitem v praktických dovednostech jako je čtení mezi řádky, sociální intuice, sebeobsluha či multitasking. Člověk s autismem obvykle dobře zpracovává detaily a jednotlivé vlastnosti věcí, mívá však potíže s komplexním nahlédnutím situace z mnoha úhlů naráz.

## **3.Trávicí soustava člověka a mikrobiom**

### **3.1. Co je střevo a jaké organismy s ním interagují**

Zažívací ústrojí člověka se skládá z dutiny ústní, zažívací trubice a žláz zažívacího ústrojí. V dutině ústní a v zažívací trubici žije nepřeberné množství organismů, lišících se nejen mezi jedinci, ale i místně v rámci jednoho individua. Bakterie ústní dutiny a hltnu osob s duševním onemocněním se liší od zdravé populace [34], přesné příčiny a důsledky této odlišnosti však nejsou známy.

Trávicí trubice se skládá z hltnu, jícnu, žaludku, tenkého a tlustého střeva. V této práci se zaměříme na část trávicí trubice následující za žaludkem, nejvíce na mikrobiom tlustého střeva. Na něm bylo provedeno nejvíce výzkumů, protože jeho obsah lze dobře přiblížit neinvazivní analýzou vzorků stolice. K přímému zkoumání obsahu tenkého střeva je zapotřebí invazivních metod (biopsie), takže je vzorků od osob s neuropsychiatrickými diagnózami k dispozici méně.

V tlustém střevě žijí anaerobní a fakultativně anaerobní organismy – bakterie, viry, kvasinky, prvoci a někdy i mnohobuněční parazité (těm se však věnovat nebudeme).

Tenké střevo dělíme na dvanáctník, lačník a kyčelník. Ústí do něj vývody trávicích žláz a dochází zde ke štěpení tuků a bílkovin a ke vstřebávání živin, včetně vitamínů. V tenkém střevě žijící organismy musejí snášet nižší pH a přítomnost trávicích enzymů.

Tlusté střevo navazuje na tenké přes výběžek zvaný apendix. Ten funguje jako imunitní orgán, obsahuje velké množství lymfatických uzlin. U člověka však pravděpodobně nemá zásadní význam – jeho chirurgické odstranění výrazně neovlivní kvalitu života. Za slepým střevem následuje tračník (colon) a konečník.

Tračník, nejdelší část tlustého střeva, neobsahuje klky. Nedochází v něm už k tak masivnímu vstřebávání živin – vstřebává se spíše voda a vytvářejí se exkrementy (feces). Žije zde hodně symbiotických bakterií, které syntetizují důležité látky (například vitamín K, B). V tračníku dochází k masivnímu kontaktu hostitele se symbionty, není proto divu, že zde vzniká prostor pro dysbiotické obtíže.

Syndrom dráždivého tračníku (*irritable bowel syndrome, IBS*) je onemocnění, které se projevuje chronickým gastrointestinálním dyskomfortem, průjmy či nadýmáním při vyloučení jiných příčin (potravinové alergie, infekce). Pod tuto diagnózu vlastně spadají všechny dysbiotické obtíže, u nichž se nepodařilo najít příčinu [35]. Svou roli může hrát aktivace imunitního systému chronickým psychologickým stresem, dietní návyky, ale i další, například genetické faktory. Průjmy související s tímto syndromem se zlepšily po probiotické terapii, aplikované v rámci dvojité slepé studie 107 žen s IBS [36]. Zároveň u těchto pacientek klesly zvýšené hladiny zánětlivých markerů CRP v séru a calprotectinu ve stolici. Mikrobiom a mírný leč chronický lokální zánět hrají v patogenezi IBS zásadní roli.

Zajímavým faktem je, že 70 – 90% pacientů, kteří vyhledají lékařskou pomoc kvůli IBS, trpí zároveň psychiatrickými komorbiditami, nejčastěji depresí. A naopak, v populaci psychiatrických pacientů jsou nespecifické zažívací potíže spojené s IBS častější než v běžné populaci [37]. I na myším germ-free modelu bylo prokázáno, že zdravý mikrobiom je k socializaci a vývoji mozku nezbytný. Myši bez střevní mikroflóry vykazovaly abnormální reakce na stres a úzkost a nepreferovaly nové sociální podněty ve srovnání s jedinci odchovanými tradičně [38].

### 3.2. Stavba a funkce střevní stěny

#### Tenké střevo

Sliznice je pokrytá buněčnými výběžky (klky), které zvětšují vstřebávací povrch. Krypty zase zajišťují sekreci hlenu.

Buňky se nejrychleji obměňují na vrcholcích klků, nejpomaleji v kryptách. Ve střevě dochází k velmi rychlému odumírání buněk a nahrazování novými.

Kromě mozku je střevo dalším orgánem náročným na tvorbu membrán a metabolismus membránových lipidů. Při narušení tohoto metabolismu lze předpokládat poruchy jak ve střevním epitelu, tak v CNS.

#### Tlusté střevo

Neobsahuje klky, zato výrazné krypty (prohlubně), které produkují hlen (mucus). Hlen chrání povrch střeva před kontaktem s přílišným množstvím mikrobů a před mechanickým poškozením. Některé druhy, například *Akkermansia muciniphilla*, se hlenem živí [39]. Přicházejí tak do těsnějšího kontaktu se střevním epitelem a pomáhají snižovat jeho propustnost, tím i hladinu LPS v krvi a aktivaci IS [40]. Této vlastnosti bylo experimentálně využito v léčbě obezity [41].

Střevní zánět se u myši experimentálně vyvolává podáním detergentů (např. DSS), narušujících střevní mukos a cytoplasmatickou membránu buněk sliznice. Schopnost narušování sliznice a podslizničních vrstev mají však i některé patogenní bakterie. Například *Porphyromonas* dokáže štěpit kolagen a stimulovat zánětlivou reakci. Ve spolupráci s dalšími druhy či chemickým poškozením zvyšuje propustnost střev [42]. Vyskytuje se také v ústní dutině, kde může působit záněty.

### 3.3. Metody zkoumání mikrobiomu střev

Nejjednodušší metodou zkoumání mikrobiomu je analýza vzorků stolice. Hodnotit lze konzistenci, hmotnost, barvu, zápach, stopy krve nebo hlenu. Již první ohledání může naznačit, že je něco v nepořádku. Na neobvyklé vyměšování často upozorní sami pacienti nebo jejich pečovatelé. I pokud problém není zjevný na první pohled, hlubší, zejména druhová analýza obsahu střev může k pochopení komplexní problematiky dysbióz přispět. Z hlediska dalších analýz je důležité, jakým způsobem byly vzorky zpracovány. Metodologická studie ukázala rozdíly ve výsledcích druhových analýz při rozdílném způsobu zpracování. Rozdílné výsledky způsobí například zmrazení vzorků před zpracováním nebo různá doba homogenizace [43]. Je možné, že i drobné rozdíly ve zpracování vzorků mohou přispívat k matoucí variabilitě výsledků jednotlivých studií.

Zánětlivé procesy ve střevě se měří stanovením hodnoty calprotectinu, což je protein uvolňovaný při aktivaci nebo rozpadu leukocytů. Protože nepodléhá enzymatické degradaci, lze pomocí něj určovat množství leukocytů ve střevě a tedy míru zánětu. Často se používá spolu se stanovením C- reaktivního proteinu z krve a sedimentace krve. Pro upřesnění lze stanovovat hladinu IgA nebo cytokinů. Hladiny pro- a protizánětlivých cytokinů jsou sledovány v mnoha studiích sledujících mírný chronický lokální zánět, protože tato metoda je mnohem citlivější než CRP nebo sedimentace. Metodou ELISA jsou změny v cytokinech opakovaně a přesně detekovány v rámci výzkumu vlivu subklinického zánětu na CNS.

#### 3.3.1. Zjišťování přítomných druhů

Kultivace [44] je nejstarší metoda zkoumání mikrobiální biodiverzity. Je nenáročná na technické vybavení, používá se zejména ke stanovení abundance konkrétních několika málo druhů. Nevýhodou je, že většinu anaerobů žijících ve střevě lze mimo hostitele kultivovat jen obtížně, nebo vůbec. Další nevýhodou je časová náročnost a pracnost ve srovnání se sekvenováním, které dokáže zaznamenat řádově více taxonů.

PCR a High throughput pyrosequencing [45] jsou metody zahrnuje zmnožení genetického materiálu ve vzorku a jeho následné pyrosekvenování. Srovnáním s databází se pak určují jednotlivé mikrobiální druhy a jejich četnost, včetně přibližné taxonomické příslušnosti mnoha nepopsaných druhů. Lze tak zjistit počet zastoupených druhů a četnost výskytu jednotlivých druhů, čímž získáme představu o ekologické diverzitě mikrobiomu. Kromě číselně vyjádřené diverzity se sledují také statisticky významné odchylky od kontrol v zastoupení konkrétních rodů a druhů. Zde je třeba mít se na pozoru kvůli výrazné interindividuální variabilitě mikrobiomů.

Zajímavým, leč na provoz extrémně finančně náročným odvětvím je analýza střevního viromu. Jeho diverzita a význam pro fungování ekosystému a vztahů s hostitelem je zatím nedocenená. Ze všech druhů střevních bakteriofágů bylo dosud popsáno jen něco málo přes 5% [46].

Targeted Quantitative PCR se používá, když nás zajímá zastoupení konkrétních taxonomických jednotek. Například lze stanovit celkové množství bakterií ve vzorku a procentuelní zastoupení určité skupiny, např. poměr *Bacteroidetes*/*Firmicutes*.

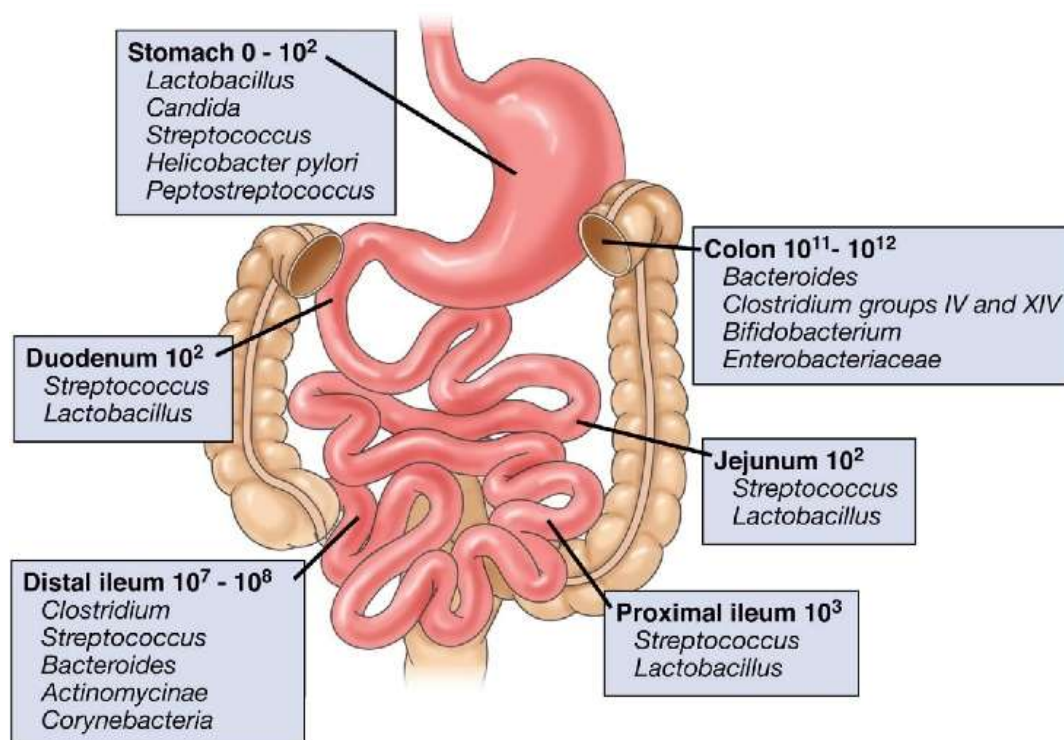
ELISA se ve výzkumu komunikace GIT a CNS používá pro stanovení nepatrných množství konkrétních proteinů v moči, séru nebo stolici, např. exorfiny, které mohou unikat ze střeva, ovlivňovat mozek a být vylučovány močí.

### 3.4. Zdravý mikrobiom střev – nejběžnější mutualistické/komenzální taxony a jejich zastoupení

V žaludku vzhledem k nehostinnému prostředí velkou diverzitu nenajdeme, přesto i zde mikrobi žijí a podílejí se na zdravotním stavu hostitele.

V tenkém střevě je již situace pro nás zajímavější. Žijí tu zejména druhy rodu *Streptococcus*. Zajímavá je příbuznost s organismy způsobujícími obávané infekční neuropsychiatrické onemocnění dětí PANDAS. Protilátky proti streptokokům byly ve zvýšené míře detekovány u Tourettova syndromu [47], což je neurologické onemocnění s častými psychiatrickými komorbiditami. Dále tu žije komenzální a potenciálně patogenní taxon *Clostridiales*. Z obecně uznávaných mutualistů nacházíme v tenkém střevě rod *Lactobacillus*. Diverzita i abundance mikrobů stoupá směrem od žaludku ke konečníku.

Nejbohatší a nejpočetnější mikroekosystém má tlusté střevo, kde dominuje rod *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* a *Enterobacterium* [48].



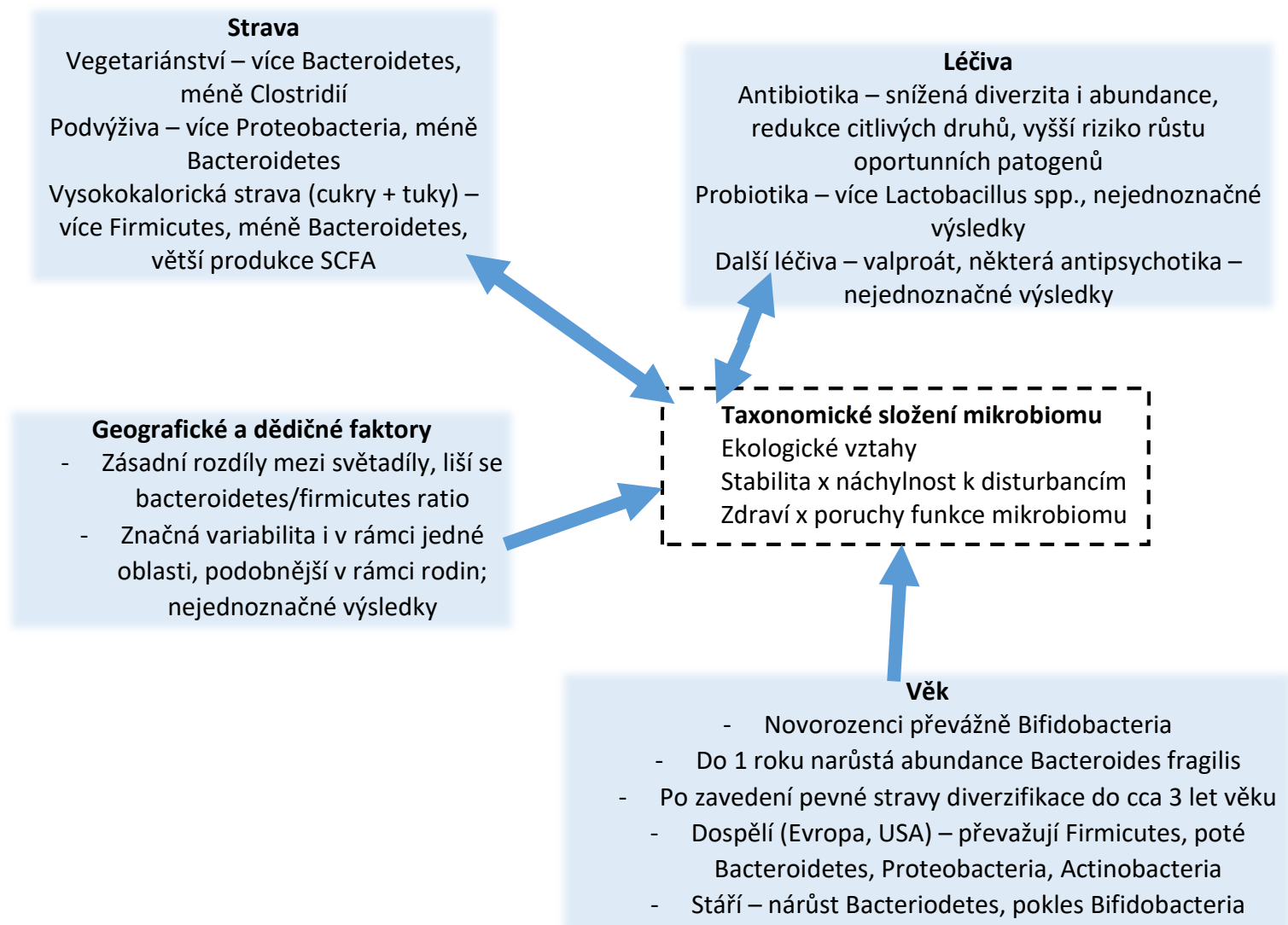
Obr. 2: Nejběžnější taxony obývající různé části zažívacího traktu zdravého člověka. Převzato z [48].

### 3.5. Příčiny interindividuální variability mikrobiomu

Kompozice mikrobiomu je variabilní v čase i mezi jedinci. Vzhledem k velké redundanci ekosystému, se tato variabilita ve většině případů neodráží negativně na zdravotním stavu – je mnoho cest, jak může ekosystém fungovat. U dospělého člověka s dostatečnou diverzitou je ekosystém



stabilní a i po velkých zásazích (infekce, širokospektrá antibiotika) se ve většině případů rovnováha obnoví, byť nový mikrobiom nemusí být shodný s tím původním.



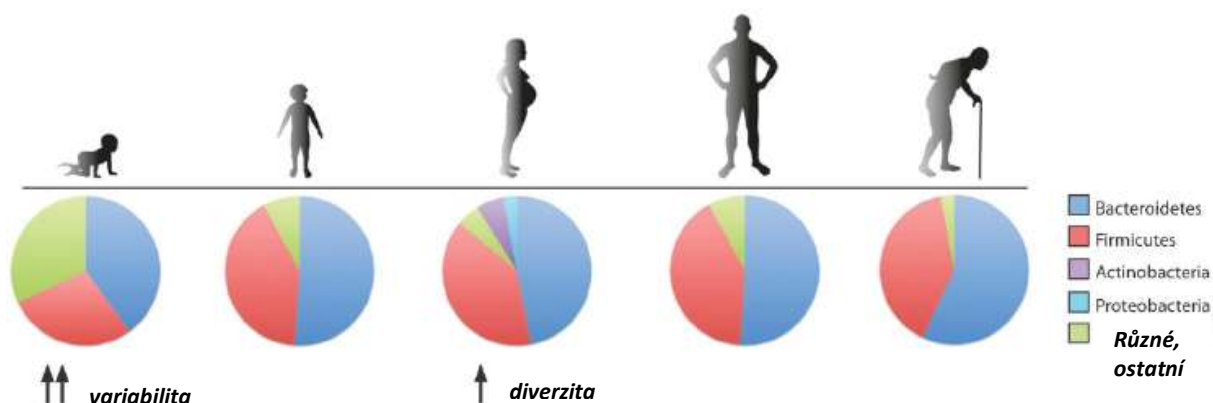
Obr. 3: Přehled nejvýznamnějších příčin interindividuální variability mikrobiomu. V modrých rámečcích najdete faktory ovlivňující druhové složení mikroekosystému (strava [18], xenobiotika [49], geografická poloha a dědičnost mikroflóry [3], změny v rámci věku [50]). Bílý rámeček uprostřed shrnuje, na co dané faktory působí. Oboustranné šipky znázorňují vzájemné ovlivňování faktorů.

### 3.5.1. Změny v závislosti na věku jedince

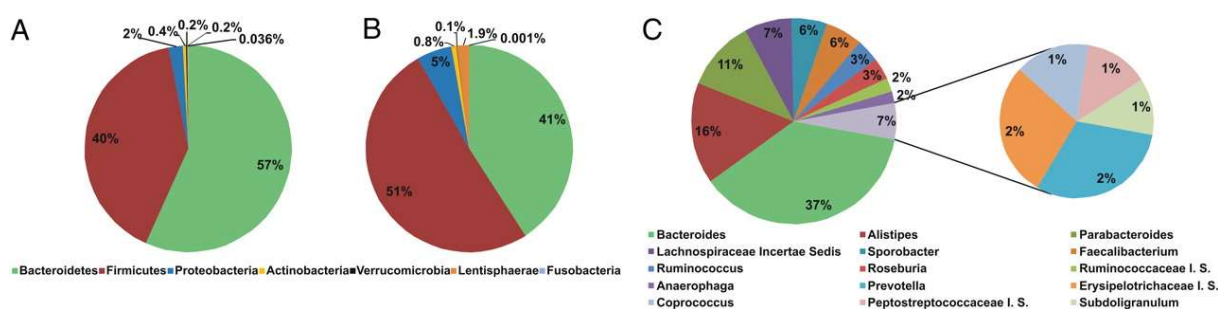
Novorozenci hostí ve střevě převážně rod Bifidobacterium [51] a jejich mikrobiom je zranitelný. Vaginálně narozená miminka mají mikrobiom podobnější mikrobiomu matky, zatímco děti narozené císařským řezem jsou kolonizovány spíše kožními mikrobiy a vykazují větší interindividuální variabilitu [52].

Během prvního roku narůstá abundance Bacteroides fragilis a zvyšuje se postupně diverzita. Velký boom diverzifikace nastává s přechodem na pevnou stravu [51]. Příliš brzký přechod, nebo současně působící disturbance, může způsobit narušení vývoje. Za zamyšlení stojí fakt, že autistický regres u dětí, které jím projdou, nastává nejčastěji mezi 1. a 2. rokem života tedy v době, kdy mikrobiom prodělává bouřlivý rozvoj a imunitní systém se musí vyrovnat se spoustou nových antigenů z potravy. Úspěšnost tohoto vývoje závisí do značné míry na stavu mikrobiomu před zavedením

příkrmů [51], [53]. Detailněji se však souvislostí příkrmů, disturbancí a rozvoje duševních poruch, pokud je mi známo, dosud nikdo nezabýval.



Obr. 4: Změny v zastoupení nejvýznamnějších taxonů v průběhu života zdravého člověka. Obrázek naznačuje trendy těchto změn, konkrétní procentuální zastoupení taxonů se může lišit. V raném dětství je velká interindividuální variabilita v druhovém složení. Ta postupně klesá, mikrobiom se diverzifikuje a stává se stabilnějším vůči disturbancím. Ve třech letech věku již mikrobiom dítěte připomíná svým složením dospělé. Největší diverzitu zdravého mikrobiomu vidíme v dospělosti. V těhotenství se zvyšuje zastoupení Actinobakterií a Proteobakterií i celková diverzita, po porodu se druhové složení opět vrací k normálu. Ve stáří diverzita naopak klesá opět se zvyšuje náchylnost k narušení ekosystému a následným zdravotním komplikacím. Převzato z [53].



Obr. 5: Taxonomické složení mikrobiomu u seniorů. (A) analýza 187 vzorků stolice starších osob, (B) složení u 9 mladších dospělých zdravých kontrol, (C) analýza do úrovně rodů u 187 vzorků starších osob. Převzato z [50].

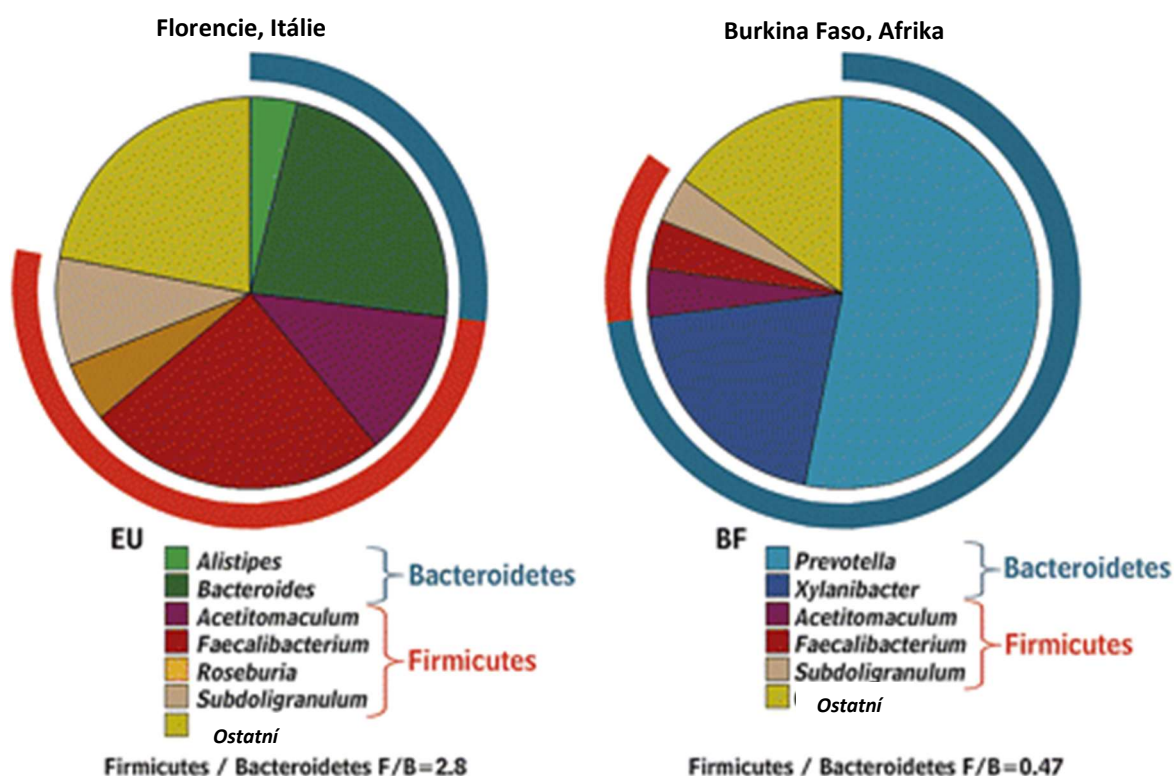
### 3.5.2. Variabilita zdravého mikrobiomu v závislosti na lokalitě a dietě

Jeden z důvodů, proč je těžké generalizovat výsledky výzkumů v různých zemích a vytvářet metastudie je extrémní interindividuální variabilita zdravého mikrobiomu v závislosti na geografické lokalitě. Příčiny mohou být jednak genetické a etnografické, jednak kulturní (zejména stravovací návyky).

Na obrázku 6 vidíte abundanci nejvýznamnějších taxonů u zdravých dětí v Africe, které dle autora konzumují především rostlinnou potravu bohatou na polysacharidy, a děti v Itálii, jejichž stravu tvoří ve větší míře tuk a bílkoviny. Rozdílnost mikrobiomu je s největší pravděpodobností způsobena právě odlišnými dietními návyky.

Nejvíce bije do očí úplně opačný poměr Firmicutes k Bacteroidetes na znázorněných grafech. „Zdravý, normální“ poměr lze tedy pravděpodobně stanovit vždy pouze ve vztahu k dané kultuře a nelze jej generalizovat.

Nejvíce článků pochází z USA a z Asijských zemí, lze tedy předpokládat velké rozdíly ve výsledcích jednotlivých laboratoří. Rozporuplné výsledky skutečně existují, a „normální“ generalizovaný poměr taxonů se mi nepodařilo dohledat – každá studie uvádí v závislosti na věku a stravování coby normu jiná čísla. Obecně je však nižší poměr Firmicutes/ Bacteroidetes považován za signál stabilnějšího mikrobiomu a dysbiotici mají vzhledem ke kontrolním zdravým subjektům stejného věku a kultury poměr mírně vyšší. Rozdíl však nedosahuje takových rozměrů, jako při interkulturním srovnání.



Obr. 6: Extrémní odlišnost mikrobiomu zdravých dětí v závislosti na lokalitě. Článek současně pojednává o vyšším výskytu gastrointestinálních potíží italských dětí ve srovnání s dětmi z afrických zemí s výrazně odlišným stravováním. Červeně vyznačené Firmicutes, modře Bacteroidetes. Pod grafem najdete výčet nejzastoupenějších rodů a poměr Firmicutes/ Bacteroidetes (F/B) u dětí z Florencie a z Burkiný Faso. Převzato z [54].

## 4. Dysbióza, její vznik a druhové změny

### 4.1. Rizikové environmentální faktory vzniku dysbiózy během raného vývoje

Prvních 1000 dnů života člověka je označováno jako kritická perioda pro vznik a rozvoj zdravého mikrobiomu. Během této doby se musí ekosystém vyrovnat se spoustou rizik [51].

Výrazným zásahem do lidského mikrobiomu je užívání antibiotik. Narušuje společenství a oslabuje konkurenceschopnost prospěšných druhů, čímž umožňuje kolonizaci střev patogeny a vznik dysbiózy. Studie prováděná na 871 respondentech prokázala, že antibiotika podávaná v prvním roce života mají signifikantní negativní vliv na emoce, chování a duševní schopnosti dětí, měřené v 3,5, 7 a 11 letech. Tyto děti měly v průměru o téměř 3 body nižší IQ a horší čtenářské schopnosti v 7 letech. Prožily také těžší období vzdoru, vykazovaly dle hodnocení rodičů a učitelů více projevů ADHD a v 11 letech byly dle rodičů i sebehodnocení úzkostnější a měly větší sklony k depresi. Oproti tomu užívání antibiotik matkou v těhotenství, ani jejich užívání po dovršení 1 roku života nekorelovalo s kognitivním a emocionálním zhoršením. Vliv neměly ani hospitalizace v dětství, což ukazuje, že antibiotika, a nikoli dětské nemoci samotné, jsou příčinou. Období do jednoho roku života se pak dle této studie jeví jako kritické pro ustanovení stabilní mikroflóry střev [55]. Pro ověření těchto závěrů by bylo třeba sledovat u respondentů ještě stav mikrobiomu a známky dysbiózy, zvětšit počet respondentů a zpřesnit dotazování ohledně dávků a typu antibiotik.

Kromě užívání antibiotik v raném dětství ovlivňuje složení mikroflóry také způsob porodu. Dítě v děloze nežije v úplně sterilním prostředí. S mikroflórou matčina organismu se v malé míře setkává již před porodem. Výrazný rozvoj mikrobiomu však začíná až během porodu. Děti narozené císařským řezem mají dlouhodobě pozměněný mikrobiom. Jejich střevo obsahuje více druhů z povrchu těla, kolonizace je náhodnější a variabilita mezi novorozenci větší. Vaginálně narozené děti mají ve střevě velké množství laktobacilů a skladba jejich mikrobiomu zpočátku připomíná vaginální mikrobiom matky [50]. Císařský řez, bez ohledu na gestační týden jeho provedení a bez ohledu na nutnost antibiotické profylaxe, zvyšuje riziko autismu [26]. Absence přirozené kolonizace vaginálními laktobacily narušuje vývoj mikrobiomu a s ním i raný vývoj imunitního systému. To může u vulnerabilních jedinců vést k řadě zdravotních komplikací, včetně neurovývojových poruch a pravděpodobně i autismu.

Infekce močových cest [56] či jen stresem pozměněný vaginální mikrobiom matky před porodem [57] ovlivňují střevní mikrobiom a zvyšují riziko neurovývojových poruch. Změny vaginálního mikrobiomu matky ovlivňují dokonce aminokyselinový profil mozku novorozenců [57]. To opět naznačuje důležitost kolonizace zdravou vaginální mikrobiotou během porodu pro vývoj střev, imunity, ale i mozku. Předčasný porod, možná i v souvislosti s častější antibiotickou profylaxí a císařským řezem u předčasně narozených dětí, se pojí s nestandardním mikrobiomem [58] a zároveň zvýšeným rizikem autismu [56].

Novorozenec potřebuje ke zdravému vývoji mikroekosystému střev dostatečnou příležitost ke kolonizaci laktobacily, absenci disturbancí v podobě infekcí nebo antibiotik, ale také dostatek esenciálních živin pro tvorbu a opravy membrán (střeva, ale i mozku) a pro správné fungování imunitního systému. Nedostatek esenciálních mastných kyselin [59], [60], [61] nebo vitaminů [13] v raném vývoji hraje roli v některých případech dysbiózy a narušeného neurovývoje dětí. Jedním z mechanismů narušení raného vývoje může být zvýšená zánětlivá aktivita imunitního systému vlivem dysbiózy, poškození oxidativním stresem a narušení buněčné signalizace vyvíjejícího se mozku přítomností prozánětlivých cytokinů v senzitivní periodě. Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a některé vitaminy působí protizánětlivě a chrání organismus před excesivní imunitní reakcí.

#### **4.2. Rizikové faktory pro mikrobiom dospělého typu**

Mnohé vzorce zapsané do mikrobiomu v jeho raném vývoji přetrvávají až do dospělosti. Ovlivňují tak naši citlivost k disturbancím, které ekosystém našeho střeva potkávají po celý život. V dospělosti mohou dysbiózu spustit antibiotika [62], některá antipsychotika [7], alkohol [49], vysokokalorická strava [18], nedostatek pohybu [63], potravinové alergie [27], [64], psychologický stres [65] a zřejmě i mnoho dalších.

#### 4.3. Široké spektrum druhů: hendikep nebo výhra?

Velkou druhovou diverzitu považuje většina autorů za plus [6], [68], protože umožňuje větší funkční redundanci ve společenství. Pokud některý druh vymizí, může ho v ekosystému nahradit jiný přítomný. Na druhou stranu však u některých dysbióz paradoxně nacházíme diverzitu zvýšenou [2]. Zvýšená biodiverzita byla zjištěna také u alkoholiků [49], u nichž je obecně vyšší míra dysbióz. Příčinou tohoto neobvyklého jevu je pravděpodobně výskyt široké palety oportunistických druhů, které se ve zdravém mikrobiomu neprosadí.

Snížená druhová diverzita byla detekována pomocí high throughput sekvenování vzorků stolice 50 lidí s Rettovým syndromem [67]. Sníženou diverzitu, navíc korelující s tíží symptomů, zjistili také u 20 dětí s autismem pomocí pyrosekvenování V2/V3 regionů bakteriální 16S rDNA ve vzorcích stolice. Snížená diverzita nebyla vysvětlitelná dietními zvyklostmi dětí a nesouvisela statisticky ani s tíží gastrointestinální symptomatiky [68]. Snížená diverzita v kontextu dysbiózy byla demonstrována také na myších s vysokosacharidovou dietou [18].

#### 4.4. Poměr Bacteroidetes/Firmicutes – marker dysbiózy s velkou variabilitou

U zdravého člověka tvoří Bacteroidetes cca 70% mikrobiomu a Firmicutes necelých 20%. Dalšími významnými třídami jsou Actinobacteria (do 3%), Proteobacteria (do 1%) a Verrumicrobia (do 0,1%), s velkou interindividuální variabilitou a komplexními změnami v zastoupení jednotlivých taxonů během vývoje jedince. Vyšší zastoupení Firmicutes mají osoby se západním stylem stravování, více Bacteroidetes mají vegetariáni a obyvatelé zemí s tradičně velkým podílem rostlinné stravy [54]. Snížený výskyt Bacteroidetes a zvýšený výskyt Firmicutes patří ke klasickým manifestacím dysbiózy. Byl prokázán u Rettova syndromu [69], autismu [1], obezity [18] a dalších, viz tabulka 1.

Ačkoli poměr dvou nejčastěji zastoupených tříd v ekosystému je důležitým markerem nerovnováhy, nemusí být její příčinou. V obou velkých skupinách najdeme druhy prospěšné, komenzální i patogenní, přičemž role druhu se mohou měnit v závislosti na fyziologickém kontextu. Například běžný komenzální druh *Bacteroides fragilis* (bacteroidetes) je dáván do souvislosti s Alzheimerovou nemocí. U stárnoucího organismu dochází k rozvolňování střevní bariéry a k patologické aktivaci imunitního systému lipopolysacharidy, které tato bakterie sekretuje na svůj povrch [66].

#### 4.5. Změny v zastoupení komenzálních taxonů při dysbióze

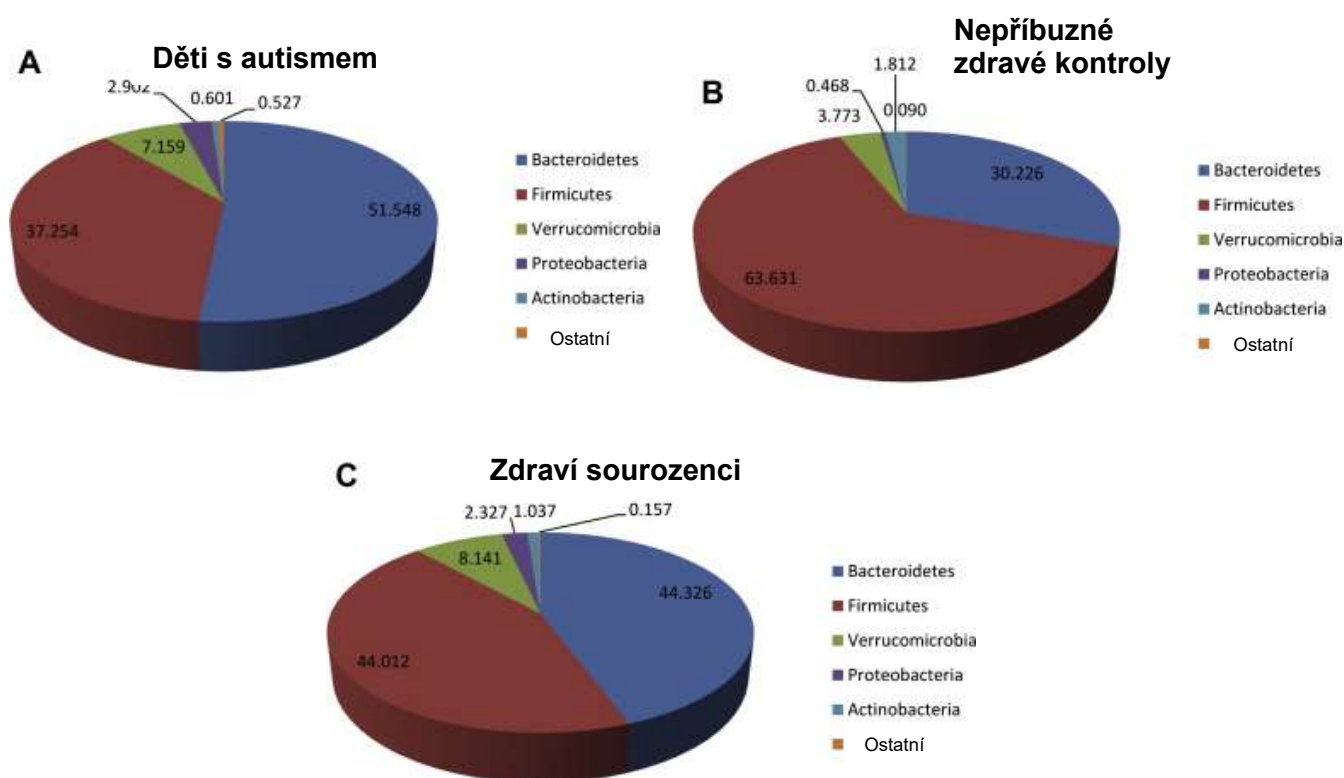
Velké množství studií, zejména sekvenování vzorků stolice, odhaluje statisticky významné odlišnosti v zastoupení běžných taxonů mezi osobami s neuropsychiatrickou diagnózou a zdravými kontrolami (viz tabulka 1). Téměř každá studie odhalí signifikantní odchylky v běžných taxonech, jejich směr si ale často protirečí. Například pyrosekvenční analýza stolice dětí s autismem a nespecifickou pervazivní vývojovou poruchou ukázala u těchto dětí zvýšené zastoupení bacteroidetes a snížené zastoupení firmicutes, a zároveň přemnožení clostridií spadajících do firmicutes a zvýšenou biodiverzitu [2].

Rozdílné výsledky jednotlivých studií mohou odkrývat heterogenitu neuropsychiatrických poruch, kde dysbióza se u různých skupin projevuje různě. Může k nim také přispívat rozdílná metodika analýz a přípravy vzorků.

<b>Taxon</b>	<b>Abundance u poruch CNS</b>	<b>Souvislosti</b>
Firmicutes	Zvýšená u deprese [70] a autismu [1], [71], snižená u autismu [72], snižená u deprese [73]	Změna oproti normě pro danou populaci naznačuje dysbiózu
Bacteroidetes	Snižená u deprese [70], alkoholismu [49] a autismu [1], [62], [65], zvýšená u těžkého autismu, speciálně B. vulgatus [63], zvýšená u deprese [64]	Bacteroidetes produkují SCFA, B. Fragilis produkuje prozánětlivý LPS.
Proteobacteria	Zvýšená u deprese [64] a autismu [63]	
Actinobacteria	Zvýšená u deprese [61] [64], snižená u autismu [63]	
Prevotella	Snižená u dětí s autismem [68], Zvýšená u deprese [70]	Příčinou možná špatné vstřebávání cukrů a jejich vysoký obsah v tlustém střevě.
Sutterella	Mírně snižená u dětí s autismem [68], zvýšená u autismu [2], [65], snižená u autismu s GI symptomy [74]	
Coprococcus	Snižená u dětí s autismem [68]	
Enterococcus	Zvýšená u Rettova syndromu [67], zvýšená u deprese [64]	
Lactobacillus	Zvýšená u autismu [62], [65], [28] a Rettova syndromu [67]	
Bifidobacterium	Zvýšená u Rettova syndromu [67], Snižená u autismu [68] s GI symptomy [28], [1]	Méně u předčasně narozených dětí [47].
Streptococcus	Zvýšená u alkoholismu [49]. Zvýšená u deprese [70]	
Klebsiella	Zvýšená u deprese [70]	
Alistipes	Snižená u autismu [1], Zvýšená u deprese [73], zvýšená u autismu [2]	
Shigella	Zvýšená u rettova syndromu [67], zvýšená u autistů se zácpou [65]	Oportunní patogen, původce průjemového onemocnění shigelloza.
Akkermansia	Výrazně zvýšená u některých dětí s autismem [2], [68], snižená u autismu [68]	Je příčinou snížené diverzity, snižuje propustnost střev.
Faecalibacterium	Snižená u deprese [64], snižená u autismu [68] a crohnovy nemoci [75]	Negativní korelace s tíží symptomatiky. Citlivý k některým antibiotikům [52]. Má antiinflamatorní schopnosti, blokuje produkci prozánětlivého IL-8.
Clostridium	Zvýšená u autismu [2], [74], C. XI zvýšená u deprese [70], C. XIV zvýšené u rettova syndromu [67], C. XVIII zvýšený u autistů se zácpou [65], C. perfringens více a toxičtější u autistů [17], C. histolyticum četnější u autistů a zdravých sourozenců [68]	Korelace s GI symptomy a hladinou prozánětlivých cytokinů [61].
Desulfovibrio	Zvýšená u autismu [64]	Korelace s tíží symptomatiky. Produkuje LPS a škodlivý H <sub>2</sub> S. Zvýšená také u ulcerózní kolitidy [76].
Porphyromonas		p. gingivalis hraje roli v patologicky zvýšené propustnosti střev [77]
Veillonellaceae	Snižená u dětí s autismem [65], [68]	
Druhá diverzita	Snižená u dětí s autismem [68], [1], Rettovým syndromem [67], zvýšená u akutní deprese [62], zvýšená u dětí s autismem [72]	Snižená diverzita je známkou dysbiózy, zvýšená může znamenat výskyt pro tuto lokalitu neobvyklých patogenních druhů. Zvýšená diverzita byla odhalena u sportovců [54] spolu se sníženými markery zánětu a dobrým zdravotním stavem.

*Tabulka 1: Přehled taxonů souvisejících s dysbiózou u neuropsychiatrických poruch, včetně příkladů studií a diagnóz u nichž byla odchylka zaznamenána*

Protichůdné výsledky studií v tabulce 1 zejména u autismu je možné vysvětlit více subtypy u této diagnózy. Pak by zjištěné odchylky v zastoupení taxonů záležely na volbě probandů. Zajímavou hypotézou by bylo rozdělení patologie mikrobiomu autismu na typ „Clostridiový“ a typ „Bacteroidetes“. Část autistické populace trpí průjmami, křečemi, hyperaktivitou, anorexií a kachexií, přičemž tyto příznaky mohou být za určitých okolností zhoršovány produkty clostridií a jiných fermentátorů. Druhá část naopak trpí přejídáním, obezitou, unavitelností, svalovou hypotonií, případně zácpou, což by odpovídalo excesivnímu zvýšení některých Bacteroidetes. Oba extrémy je možné při dysbióze najít. Vzhledem k obvykle malým studovaným vzorkům autistické populace stačí, aby v dané lokalitě žilo více osob s mikrobiomem prvního typu, a objeví se „clostridiový“ mechanismus autismu, v další studii vyvrácený detekcí naopak sníženého množství clostridií. V dysbióze hrají roli i další druhy v tabulce, tím že ji svou přítomností nebo absencí pomáhají udržovat. Hypotéza s rozdělením typů autismu dle vnějšího projevu a následnou analýzou vzorků stolice pokud vím nebyla zatím testována. Ideu subtypů autismu a působení clostridií pouze v některých případech nemoci poprvé představil Bolte [8], o mikrobiálních subtypech se zmiňuje také Finegold [78] v souvislosti s bakterií *Desulfovibrio*.



Obr. 7: Skladba mikrobiomu dětí s autismem, zdravých sourozenců a nepříbuzných zdravých kontrol. Složení mikrobiomu sourozenců leží na pomezí autistické a běžné populace. K volbě kontrol je potřeba přistupovat s opatrností. Upraveno dle [72].

#### 4.6. Patogenní druhy bakterií u neuropsychiatrických poruch

Dysbiózu může způsobit nebo udržovat infekce patogenním organismem. Zatímco zdravá mikroflóra prostorově brání uchycení nebezpečných bakterií, kvasinek či primitivních eukaryot, její narušení, například antibiotiky, nebo nedostatečná kolonizace v raném dětství může takový prostor poskytnout. Velká část komenzálních organismů žijících ve střevě má schopnost stát se při narušení ekologické rovnováhy patogenními.



#### 4.6.1. Rod *Clostridium* – producent toxinů

Častým střevním komenzálem jsou různé druhy rodu *Clostridium*. Liší se mírou škodlivosti, od úplně neškodných až po producenty silných cytotoxinů a neurotoxinů [20]. Clostridie jsou gram-pozitivní obligátně anaerobní bakterie patřící mezi Firmicutes a jsou schopné tvořit odolné spory. Existuje jich kolem 100 druhů, z nichž některé žijí ve vlhké půdě, jiné v trávicím a rozmnožovacím traktu hostitelů. Clostridie se našly ve zvýšené míře ve stolici dětí s autismem [2], které zároveň měly ze zkoumaných skupiny největší zastoupení Bacteroidetes (nikoli Firmicutes, jak bychom očekávali). Clostridie prokazatelně žijí v lidských útrokách a jsou jedinými producenty řady potenciálně toxických látek, např. fenolů, p-kresolu nebo indolových derivátů [79].

*Clostridium difficile* se nachází ve střevě 2-5% zdravé populace. Při narušení mikrobioty může dojít k jeho přemnožení, což vede k silným průjmům.

*Clostridium Botulinum* způsobuje nebezpečné otravy jídlem, jelikož obsahuje silný neurotoxin. Ten se využívá mimo jiné v plastické chirurgii k ochabnutí mimického svalstva a zmenšení vrásek. Těžké bývají střevní infekce kojenců touto bakterií. Botulotoxin produkují také *C. botulinum* a *C. baratii*.

*Clostridium perfringens* je v malém množství v lidském střevě běžný a obvykle neškodný [80]. Pokud se však vymkne kontrole, například při požití většího množství spor z nedostatečně tepelně upraveného masa, nebo u imunosuprimovaných jedinců, způsobuje průjmové onemocnění s křečemi a kolikou. Bakterie produkuje enterotoxin, který proniká plasmatickou membránou buněk a vytváří v ní póry. Onemocnění je málokdy smrtelné. Většina populace má proti toxinu protilátky, což znamená, že se s lehčí formou otravy setkala [20]. U dětí s autismem a GI abnormalitami bylo detekováno větší množství *C. perfringens* oproti zdravým kontrolám, a zároveň hostily autistické děti kmeny produkující signifikantně větší množství beta-2-toxinu [20].

*Clostridium tetani* je nejznámějším clostridiem, protože způsobuje obávané onemocnění s horečkou, deliriem a těžkými svalovými křečemi. Křeče jsou způsobeny neurotoxinem zvaným tetanotoxin, který z místa infekce putuje do míchy a narušuje inhibiční neurotransmisi motorických nervů. *C. tetani* produkuje ještě cytotoxický tetanolysin, který vytváří póry v membránách buněk. Existuje poměrně radikální hypotéza [8], [81], že některé formy autismu jsou chronickou střevní infekcí *C. tetani*. Ta se neprojevuje akutní formou s křečemi kosterního svalstva, protože ze střeva se bakterie ani jejich toxin nemohou dostat k míšním nervům, které svaly ovládají. Tetanolysin byl však detekován v mozku člověka s autismem [8], což by vysvětlovalo poškození membrán dlouhých spojů, které jsou u autismu narušené. Bolte se domnívá, že toxin se do mozku dostal ze střeva retrográdním transportem přes nervus vagus. Chronická střevní tetanová infekce by vysvětlovala také záživací a motorické potíže lidí s autismem – ztuhlou mimiku, dyspraxii, dyslalii, mutismus, tiky, špatné sání a polykání. Chronická forma tetanu byla u dospělého člověka dokonce diagnostikována, s motorickým projevem velmi podobným některým formám autismu. Antibiotikum Vancomycin, účinné proti clostridiím a působící pouze v záživacím traktu, prokázalo v některých případech autismu svou účinnost [23].

Ačkoli vypadá teorie autismu jako infekce nebezpečnou bakterií velmi lákavě, má i svá úskalí. Zprvu, *C. tetani* nebyla ve většině podrobných studií ve vzorcích stolice autistů vůbec detekována [10], [68], [82], [1], [2], [72], [83], což chronickou infekci touto bakterií spolehlivě vyvrací. Zadruhé antibiotikum Vancomycin pomohlo jen malé části pacientů, přičemž jiné výzkumné skupiny objevily pozitivní efekt mnoha jiných terapeutických přístupů, což opět ukazuje autismus jako komplexní a multietologické onemocnění. Vancomycin je navíc účinný proti celé řadě mikroorganismů, takže jeho účinnost v léčbě behaviorálních projevů autismu nelze považovat za důkaz přítomnosti clostridií, tím spíše ne jednoho konkrétního druhu.

Rod *Clostridium* byl opakovaně prokázán ve zvýšené míře u dětí s autismem (viz tabulka 1). Ačkoli se nejednalo o jeho nejvirulentnější druhy, i ty, jež se u dětí našly, mají schopnost syntetizovat



řadu škodlivých produktů. Je tedy možné, že tento rozsáhlý taxon přispívá v některých případech k patogenezi GIT a CNS symptomů.

#### **4.6.2. Rod *Desulfovibrio* – producent sulfanu**

*Desulfovibrio* (Proteobacteria) je gram negativní pohyblivá anaerobní bakterie, která netvoří spory. Žije volně v substrátech, některé druhy se vyskytují i v zažívacím traktu člověka (konkrétně ve slizové vrstvě střevního epitelu). *Desulfovibrio* umí redukovat sulfát na  $H_2S$ , který je člověku škodlivý. Je oportunním patogenem – přítomnost malých počtů této bakterie je běžná a nezpůsobuje žádné příznaky, při narušení mikrobiomu však může vyvolat onemocnění. Zvýšený výskyt byl detekován u ulcerózní kolitidy [76].

#### **4.6.3. Rod *Porphyromonas* – bakterie narušující střevní stěnu**

*Porphyromonas* je oportunní patogen žijící v ústní dutině a příležitostně ve střevě má vysokou schopnost narušovat bariéru střevního epitelu. Disponuje enzymy schopnými štěpit kolagen ve vazivu hostitele a zároveň výrazně stimuluje imunitní odpověď. Jeho jednorázové orální podání myším způsobilo zvýšení propustnosti střevní sliznice, vyšší hladinu LPS v krevním séru a bakteriální DNA v játrech, což naznačuje zvýšenou míru translokace střevních bakterií skrz epitel [77].

### **5. Fyziologické mechanismy, kterými střevní bakterie ovlivňují mozek**

Střevní mikroflóra může působit na mozek člověka mnoha způsoby. Nejmarkantnější jsou změny u pacientů s klinicky významnými duševními poruchami, mikrobiom ale ovlivňuje psychický stav i u zdravé populace.

Podávání probiotik po dobu 4 týdnů 20 zdravým dobrovolníkům vedlo ke snížení počtu negativních myšlenek v reakci na nepříjemnou událost („*cognitive reactivity*“), ubyly především myšlenky s agresivním obsahem a přehnané rozebírání příčin a následků události. Kognitivní reaktivita se měří standardizovanými testy a je měřítkem hrozící deprese u subklinické populace. U 20 kontrolních subjektů užívajících placebo zůstaly hodnoty kognitivní reaktivity na bazální úrovni. Zdraví dobrovolníci užívající probiotika tedy vykazovali lepší reakci na stresovou situaci, méně se poddávali negativním myšlenkám a byli dle standardních psychologických testů odolnější vůči depresi než dobrovolníci užívající placebo [84].

Probiotické kmeny bakterií snižují prozánětlivou aktivaci imunitního systému. Přítomnost zánětu v těle narušuje i u zdravých dospělých schopnost sociální kognice (nižší skóre v testu čtení emocí z obličeje) [85] a další psychologické funkce.

Podávání probiotik zdravým lidem tedy může pozitivně ovlivňovat mozek díky mechanismu protizánětlivé profylaxe. Možné jsou ale i další mechanismy, například produkce neurotransmiterů a jejich prekursorů. Dobře zdokumentovaná je například produkce gama-aminomáselné kyseliny (GABA), jednoho ze základních inhibičních neurotransmiterů s anxiolytickým efektem, lactobacily a bifidobakteriemi [19].

Do mozku se kromě nutričních a stavebních látek mohou v některých případech dostat i škodlivé produkty střeva. Ve zdravém organismu jim stojí v cestě epiteliální bariéra střevní sliznice tvořená buňkami s těsnými spoji a hematoencefalická bariéra. Pokud má narušený mikrobiom svými produkty přímo chemicky ovlivňovat mozek a přispívat k duševním onemocněním, musí nejprve selhat tyto přirozené ochranné mechanismy. Neadekvátní množství neuromodulátorů, hormonů a toxinů vznikající při dysbióze se musí dostat zkrz střevní stěnu do krevního oběhu. Poté musí tyto látky proniknout do mozku. Například glutamát z potravy za normálních okolností proniká do mozku

z potravy v minimálním množství. Následující podkapitola vysvětluje, jak mikrobiom ovlivňuje propustnost střevní sliznice, aktivuje imunitní systém a ten spolu s dalšími mechanismy zvyšuje propustnost hematoencefalické bariéry. Genetická variabilita genů pro bariérové proteiny by vysvětlovala různou náchylnost jedinců k tomuto patofyziologickému mechanismu a vysokou míru dědičnosti neurovývojových poruch.

## **5.1. Narušení epitelální a hematoencefalické bariéry**

Průchodu produktů mikroflóry ze střev do krevního oběhu brání bariéra tvořená těsnými spoji (tight junctions) mezi buňkami epitelu. Mohlo by se zdát, že se toxiny, větší metabolity, případně celé bakterie, ze střeva dostat nemohou. Opak je ale pravdou – i u zdravého člověka se nejen metabolity, ale i antigeny bakteriálního povrchu v malé míře v krevním oběhu nacházejí [5]. Sliznice střevní stěny je pokrytá vrstvou hlenu s obsahem antibakteriálních látek. Neškodní komenzálové sliznici aktivně nenarušují, a zároveň svou přítomností zabírají místo agresivnějším druhům, které by sliznici poškozovaly. Spekuluje se také o roli bakteriofágů [1], kteří pomáhají selektovat neškodné druhy a sliznici chránit. Analýzy virového a bakteriálního genomu ve vzorcích stolice ukázaly negativní korelaci mezi diverzitou viromu a mikrobiomu. Lidský virom je pak podobně specifický a stabilní, jako samotný mikrobiom. Studií na toto téma je vzhledem k jejich náročnosti a interindividuální variabilitě zatím poměrně málo, známe jen něco mezi 5 – 10% fágů žijících v lidském střevě.

Střevní epitelální bariéra může být narušena geneticky, například mutacemi genů pro claudiny. Závažnější mutace jsou však poměrně vzácné a následky bývají fatální.

Nejčastější příčinou zvýšené propustnosti střev (tzv. „leaky gut syndrom“) je dysregulace genové exprese, která nastává v kontextu chronické aktivace imunitního systému. Biopsie dvanáctníku 12 pacientů s autismem ukázala u 9 z nich sníženou expresi genů tvořících intestinální bariéru (CLDN-1, OCLN, TRIC) a u 8 pacientů zvýšenou expresi claudinů tvořících póry a zvyšujících propustnost střev (CLDN-2, CLDN-10, CLDN-15). Jako kontrola sloužilo 8 vzorků pacientů bez pervazivní vývojové poruchy [6]. O zvýšené propustnosti střev u pacientů s neuropsychiatrickými diagnózami existuje i mnoho dalších důkazů [5], [27], [86]. Může se však obsah střev, uniknuvší do krevního oběhu, dostat přes hematoencefalickou bariéru do mozku a přímo jej ovlivňovat?

Stejná studie [6] zkoumala 33 autoptických vzorků mozkové kůry 15 zdravých jedinců, 10 lidí se schizofrenií a 8 s autismem. Cílem bylo zjistit neuroinflamatorní procesy analýzou přítomných cytokinů, a detekovat případné změny v expresi genů pro hematoencefalickou bariéru. Všechny zkoumané cytokiny byly signifikantně nižší u autismu než u schizofrenie, přičemž u schizofrenie byla mimo jiné zvýšená exprese prozánětlivého IL-1b, který se podílí na narušení hematoencefalické bariéry. Všechny 3 skupiny bylo na základě těchto proteinů možné snadno odlišit. Expresí genů pro hematoencefalickou bariéru byla pozměněna následovně: CLDN-5, -12 (podílejí se na tvorbě bariéry), metaloproteáza podílející se na migraci leukocytů MMP-9 a mitochondriální protein z aktivovaných mikroglíí TSPO byly zvýšené u autismu. To vše naznačuje existenci imunopatologických procesů v mozku u obou neuropsychiatrických diagnóz, včetně pozměněné permeability hematoencefalické bariéry.

## **5.2. Chemická komunikace skrze narušenou bariéru**

### **5.2.1. Butyrát, propionát a další MK s krátkým řetězcem**

Butyrát, MK s krátkým řetězcem produkovaná fermentujícími bakteriemi, tvoří palivo pro enterocyty i mozek, zvyšuje aktivitu a pocit energie, při nadprodukci však může mozek poškozovat [87].

Mimo mozek působí také na imunitní systém, za fyziologických hodnot pomáhá stabilizovat epiteliální a hematoencefalickou bariéru a stimuluje nervus vagus.

Butyrát a mastné kyseliny s krátkým řetězcem procházejí do krevního oběhu snadno i za fyziologických podmínek [87], většina butyrátu je metabolizována v játrech. I v dalších orgánech včetně neuronů a buněk IS v mozku se našly receptory pro butyrát. Ten mimo jiné přispívá k acetylaci histonůinhibicí histondeacetylázy (HDAC), a při podávání vysokých dávek butyrátu depresivním pacientům došlo nejen ke zlepšení depresivních příznaků a ke zvýšené acetylaci histonů v neuronech [88]. Ačkoli se butyrát získaný ze střeva přímo v mozku nachází v extrémně malých koncentracích, neznamená to, že tam nepůsobí. Má ze všech mastných kyselin s krátkým řetězcem nejrychlejší metabolický obrat – již 5 minut po injekci do mozku potkana byla naměřená koncentrace na 20% počáteční hodnoty [87]. Nelze tedy vyloučit, zato z technických důvodů lze těžko dokázat, případné skokové změny v koncentracích butyrátu v mozku, které by naměřené hodnoty mohly přesáhnout i o několik řádů.

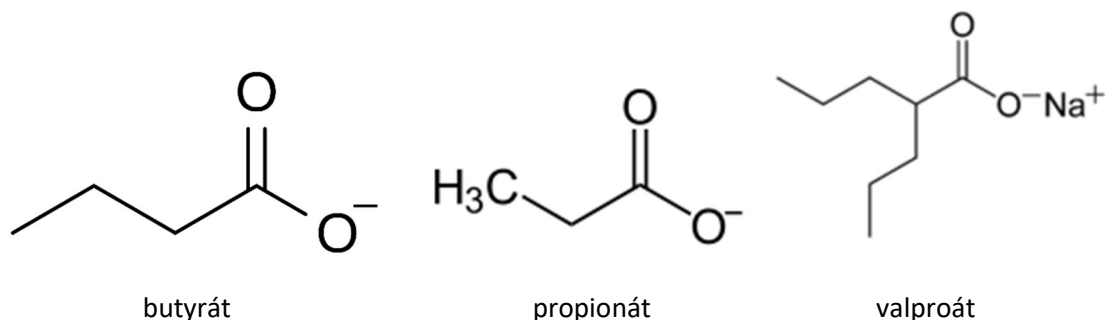
Butyrát je chemicky podobný valproátu, což je známý stabilizátor používaný v léčbě maniodepresivní poruchy, a zároveň teratogen schopný při užívání v těhotenství způsobit u potomstva projevy autismu. U dětí s autismem se našly zvýšené počty fermentujících bakterií, které produkují butyrát, zvýšená propustnost střev, a také vyšší hladiny butyrátu v krvi. V některých případech se autismus projevuje anhedonií, absencí motivace a změněným či nedostatečným chápáním vlastní nálady a pocitů a abnormálními stresovými reakcemi (většinou silně zvýšené a neadekvátní vůči podnětu – stresovou reakci a aktivaci HPAosy může způsobit i vysoká dávka butyrátu nebo propionátu [89]).

Velké množství lidí s autismem má velmi omezený jídelníček, zejména se vyhýbají syrové zelenině a stravě bohaté na vlákninu, která je substrátem pro fermentaci. Jedná se o naučené přizpůsobení a vyhýbání se nevolnosti způsobené hypotetickým „butyrátovým šokem“? V takovém případě by se vlastně autista omezeným jídelníčkem bránil excesivnímu nárůstu škodlivých bakterií. Ověřit tuto hypotézu se, pokud vím, zatím nikdo nepokusil. Pro extrémně omezený jídelníček autistů by však kromě této adaptivní hypotézy mohla ve vztahu k mikrobiomu fungovat i opačná. Vzhledem k heterogenitě autismu i jeho mikrobiologického profilu je možné, že jsou správné obě.

Stejný vzorec chování (vyhýbání se vláknině, silná afinita ke zpracovaným potravinám) se vyskytujíetéměř u všech autistů, tedy i těch s nízkou abundancí fermentátorů a sníženou produkcí MK s krátkým řetězcem. Mohlo by jít o manipulaci mikrobioty chováním hostitele, která by dávala manipulátorům evoluční výhodu? Bakterie dokážou zvýšit gastrointestinální dyskomfort, například bolest, pokud nedostanou potřebnou potravu. Kmeny s takovou schopností mohou podmiňováním naučit hostitele afinitě k potravě, která jim vyhovuje a zajistí lepší proliferaci těchto kmenů. Jednoduchou reakci vyhýbání bolesti se rychle naučí i malé dítě, a může tak nevědomky škodlivé prostředí v organismu podporovat. Tato hypotéza přímo u autismu testována nebyla.

58 dětí s autismem mělo o 27% sníženou hladinu MK s krátkým řetězcem ve stolici (acetát, propionát a valerát). Rozdíl byl ještě výraznější u těch, které užívaly probiotika. Je pravděpodobné, a přiznávají to i autoři studie, že příčinou snížení je větší vstřebávání těchto látek do oběhu díky vyšší propustnosti střev nebo pomalejšímu tranzitu. Výsledek tak nemusí být v nesouladu s obvykle detekovaným zvýšením těchto látek v séru. Studie bohužel nezahrnovala analýzu krevního séra a k detekci druhů přítomných ve stolici byla použita kultivace, která zjistila signifikantní změny pouze u *Bifidobacter* a *Lactobacillus*. Taxony související s dysbiózou a neobvyklá distribuce taxonů byly detekovány v souladu s předchozími pracemi, výsledky ale nedosáhly statistické významnosti [28].

Dobře zdokumentovanou MK s potenciálně škodlivými účinky na rozvoj sociální kognice je také propionát [90], [91], [92], chemickým chováním podobný psychofarmaku valproátu.



Obr. 8: Srovnání chemické struktury butyrátu, propionátu a valproátu. Valproát je prokázaný teratogen poškozující vyvíjející se mozek plodu.

Propionová kyselina se používá v potravinářství jako konzervant a je produkována fermentujícími bakteriemi, například rodem *Clostridium*. Injekce malé dávky propionátu do mozku mladých potkaních samců narušila sociální chování, zvýšila ulpívavý zájem o známý objekt (hračku) oproti prozkoumávání nových a snížila schopnost přeučení již naučených dovedností („kognitivní flexibilita“) [92]. Tyto projevy nápadně připomínají model autistického chování. Propionát je vstřebáván ze střeva a má schopnost procházet membránami. Ovlivňuje velké množství metabolických drah a receptorů.

V dalším experimentu udržovali potkani po aplikaci propionátu větší vzdálenost od ostatních jedinců, trávili méně času v blízkosti (<5 cm) jiného potkana, méně iniciovali sociální interakci, méně reagovali a více uhýbali při pokusu o navázání kontaktu jiným potkanem. V jejich hippocampu byla oproti kontrolám (injikován acetát, 1-propanol nebo fyziologický roztok) abnormálně zvýšená imunoreaktivita [90].

Propionát a butyrát zvýšily pohybovou aktivitu (uběhnutou vzdálenost a stereotypní pohyby) potkanů. Došlo také ke změně složení membránových fosfolipidů: snížení mononenasycených MK, omega 6 MK, fosfatidyletanolaminu, poměru omega 6: omega 3, dále zvýšení nasycených MK. Acylcarnitin a volný carnitin byly zvýšené. Patrné byly známky poruchy funkce mitochondrií. Propionát tyto změny působil více, než butyrát, za kontrolu sloužila injekce fyziologického roztoku [93]. Jeden z mechanismů působení propionátu a butyrátu v mozku je ovlivňování složení fosfolipidů v membránách. Membrány a jejich struktura jsou stěžejní pro vývoj mozku a fungování synapsí. Jejich narušení bylo studováno u autismu a dobře zapadá do teorie narušení dlouhých spojů. K podobným závěrům došli i Thomas a kol. [91].

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem a močovina byly neobvykle zvýšené u 23 dětí s autismem ve srovnání s 31 zdravými kontrolami. To naznačuje vyšší výskyt fermentátorů nebo narušené zpracování produktů fermentace. Součástí studie bohužel nebyla mikrobiologická analýza [94].

### 5.2.2. Glutamát a další volné aminokyseliny

Studie 51 autistů a 102 kontrol ukázala signifikantně zvýšenou hladinu glutamátu v krevním séru pacientů s autismem [95]. Hladina glutamátu pozitivně korelovala s tíží autistické symptomatiky dle diagnostické škály CARS.

Glutamát je excitatorní neurotransmitter. U 20 dětí s autismem byla detekována excitototoxicita, tedy stav, kdy nerovnováha mezi excitací a inhibicí vede k poškození synapsí a k neurodedeneraci. Zároveň byly zvýšené prozánětlivé cytokiny [96]. Studie 42 dětí s autismem

odhalila snížené hladiny aminokyselin cysteinu, tyrosinu a serinu a zvýšenou hladinu glutamátu v krevním séru [97].

Zvýšená hladina glutamátu přímo v mozku byla detekována i u další duševní poruchy, OCD, konkrétně u dětských pacientů. Zajímavé je, že hladina signifikantně poklesla během psychotherapeutické léčby [98]. Teoreticky mohla psychotherapie a lepší zvládání stresu zlepšit celkový stav organismu od CNS až po mikrobiom.

Rettův syndrom se projevuje těžkým neurologickým a mentálním postižením a je způsoben geneticky, v 90% případů mutací MeCP2 genu. Jedna ze studií odhalila, že příčinou poškození mozku u MeCP2 deficientních myší je glutamátergní postsynaptická neurotoxicita vyvolaná mikroglie. Ty se vyjma patologického uvolňování glutamátu chovají normálně, nejsou aktivovány jako při klasickém zánětu [69]. U Rettova syndromu jsou časté gastrointestinální potíže, nejčastěji zácpa, a narušený mikrobiom. Řešení dysbiózy zlepšilo psychomotorické funkce pacientek [67].

Při dysbióze bývají často přemnožené bakterie produkující glutamát a redukované bakterie produkující GABA. Pro tyto malé molekuly není problém projít přes hematoencefalickou bariéru. Jejich produkce ve střevě může tak přímo ovlivňovat koncentrace v mozku.

### **5.2.3. GABA a další neuroaktivní látky**

Probiotické bakterie dokážou produkovat neurotransmitery a jejich prekuzory, jejichž nedostatek negativně ovlivňuje fungování mozku. To může být jedním z důvodů úspěšnosti probiotik při prevenci úzkosti a depresí a při léčbě jejich lehčích forem [99], [100]. Producenty gama amino máselné kyseliny (GABA) jsou ve střevě především Bifidobakterie a Lactobacily [19]. GABA má v organismu mnoho funkcí, mimo jiné se podílí na inhibiční neurotransmisí. Poruchy v systému aktivačních/inhibičních synapsí byly popsány u mnoha neuropsychiatrických a neurodegenerativních poruch.

Jeden z kmenů rodu *Lactobacillus* dokáže syntetizovat acetylcholin, další z neurotransmiterů spojených s patogenezí deprese, úzkosti, psychóz, ale i demence a poruch paměti [21]. Desbonnet prezentoval v roce 2008 schopnost *Bifidobacteria infantis* produkovat tryptofan, prekuzor neurotransmiteru serotoninu, jehož dysbalance hraje zásadní roli u depresí. *B. infantis* zároveň snižovala hladinu prozánětlivých cytokinů [100].

### **5.2.4. Indolové a fenolové deriváty, exorfiny**

Střevní bakterie, zejména fermentátoři, produkují řadu potenciálně toxických produktů. V moči dětí s autismem byla detekována toxická aromatická sloučenina p-kresol, kterou mohou produkovat například clostridie [79]. Dle starších teorií je příčinou některých případů autismu chronická intoxikace molekulami podobnými opiátům, které vznikají nedostatečným naštěpením proteinů ze stravy [7], [101], [76], [102]. V kontextu zrychleného vstřebávání i poměrně velkých molekul při dysbióze je možné si únik bioaktivních peptidů ze střeva představit.

Proteiny, například lepek a kasein, jsou ve zdravém organismu naštěpány enzymy na menší polypeptidy a ty pak degradovány až na jednotlivé aminokyseliny. Jsou běžnou součástí stravy člověka. Při dysbióze a zánětu střevní sliznice jsou však procesy degradace narušeny a sliznice je propustnější. Díky tomu se do krevního oběhu mohou dostat potenciálně škodlivé peptidy, například gliadomorfin nebo kasomorfin s afinitou k opiátovým receptorům [103]. Stopy těchto molekul lze detekovat v moči. Výsledky jsou v tomto případě poměrně nejednoznačné, některé recentní studie opioidní peptidy v moči autistů potvrdily, jiné ne.

Například Reichelt a kol. v roce 2012 potvrdili přítomnost glumorfinu A a beta-casomorfinu u podskupin dětí s autismem. Mezi vzorky jednotlivých probandů byla velká variabilita. Dle těchto autorů by se opiátový mechanismus mohl týkat 5-10% autistů. Autoři zmiňují také fakt, že zvýšené podávání gliadinu a glutenu (proteiny lepku) zdravému člověku po dobu tří dnů vede k obdobnému zvýšení opiátů v moči, jaké nacházíme u některých autistů [104].

Oproti tomu rozsáhlá studie z roku 2008 v moči autistů žádné opiáty nenašla [105]. Na toto téma bylo publikováno mnoho článků s protichůdnými výsledky [106],[103], [107], [101]. Detekce proteinů v moči je jednoduchá a neinvazivní. Možnou příčinou, proč některé studie odhalí enormně vysoké hladiny opiátů a jiné žádný rozdíl oproti kontrolám, může být heterogenita autistické populace a příliš malý vzorek. Další příčinou by mohlo být použití různě citlivých technologií detekce v průběhu času, případně vyšší míra artefaktů ve starších publikacích (v novějších je více negativních výsledků).

### 5.3. Komunikace přes imunitní systém

Poruchy imunitního systému u duševních poruch je velice komplexní téma. V této práci jsem vybrala jen některé důležité aspekty ve vztahu k mikrobiomu – především chronický zánět. Aktivace imunitního systému při dysbióze může mít za následek tzv. „sickness behavior“ a sklony k úzkostně-depresivnímu prožívání [100]. Podobně působí také oxidativní stres [14].

Studie na 115 zdravých dobrovolnících ukázala, že zánět v organismu negativně ovlivňuje sociální percepci a teorii mysli. Zánět byl uměle navozen podáním endotoxinu, podání neškodné látky zhoršení nezpůsobilo – naopak, zřejmě díky učení, došlo u kontrol k mírnému zlepšení výsledků. Chyby v percepci nebyly způsobeny celkovou nevolností, neboť probandi byli z tohoto hlediska po celou dobu experimentu sledováni. Ti, kdo referovali subjektivní zhoršení zdravotního stavu, byli z testování vyloučeni [85].

Deficit sociální interakce, ať už v podobě tzv. „sickness behavior“ u depresí a úzkostí, nebo v podobě primárního deficitu sociální percepce a kognice u autismu nebo schizofrenie, je jedním ze zásadních symptomů duševních poruch. Onemocnění jako autismus, deprese nebo schizofrenie, charakteristická sociálním stažením a zhoršením sociální percepce, často doprovází mírně zvýšené prozánětlivé cytokiny v séru [67], [74], a projevy střevní dysbiózy [67], [72], [108], [74], [86].

U pacientů se schizofrenií a maniodepresí byly signifikantně zvýšené markery bakteriální translokace a aktivace imunitního systému. Autoprotilátky proti tkáňové transglutamináze (marker celiakie) byly vyšší u pacientů s maniodepresí oproti kontrolám [74].

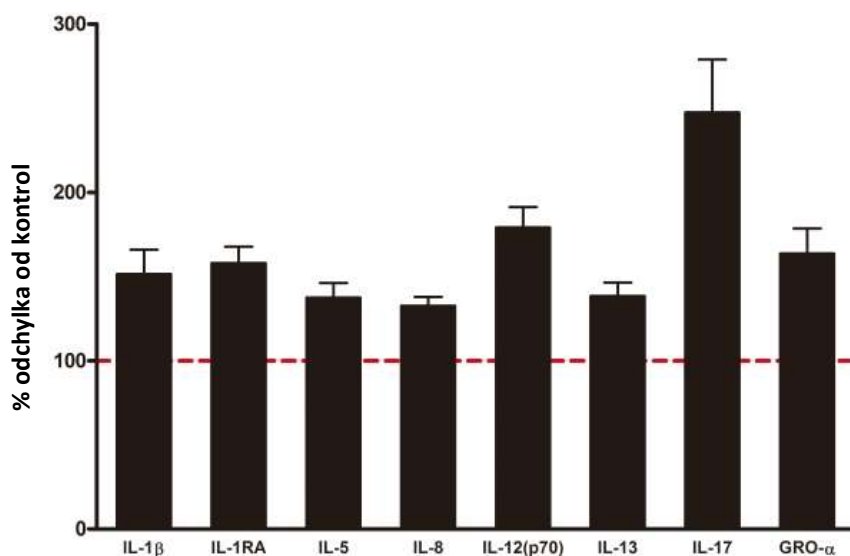
V další skupině pacientů se schizofrenií byly naměřeny vysoké hladiny specifických IgG proti potravinovým antigenům glutenu a caseinu [109].

Většinu případů psychóz se daří zvládnout antipsychotiky, určité procento nemocných však na léky nereaguje [110]. Zajímavá kazuistika popisuje náhlý rozvoj farmakorezistentní psychózy u dítěte. Do té doby zdravá dívka a vynikající studentka prošla bez jasné příčiny během několika týdnů drastickou změnou osobnosti, trpěla výkyvy nálad, agresivitou a halucinacemi, které se nepodařilo zvládnout léky ani opakovanou psychiatrickou hospitalizací. Vzhledem k přítomnosti gastrointestinálních potíží byla vyšetřena na potravinové alergie včetně celiakie, s negativním výsledkem. Přesto se lékaři rozhodli pro experimentální vysazení lepku ze stravy. Dívka se během několika dnů překvapivě zlepšila a při pokračování diety příznaky psychózy zcela zmizely. Byly provedeny placebo testy, kdy týdenní podání kapslí s obsahem lepku přivodilo pacientce návrat psychotických příznaků. Po vysazení kapslí se psychický stav normalizoval a podání kapslí s placebem psychotickou epizodu nevyvolalo. Nástup psychózy versus remise koreloval přesně s podáváním/

vysazením lepku [110]. Tento syndrom byl již dříve popsán v kazuistikách dospělých jako „non coeliac gluten sensitivity“ (NCGS).

Autor kazuistiky navrhuje vysvětlení a) mimo imunitní systém: ze střeva, které je z nějakého důvodu propustnější, se uvolňují exorfiny (gliadomorphin), ovlivňující neurotransmisi podobně jako exogenní opiáty. Tato mechanistická teorie byla v minulosti vlivná i u PAS, a stále není vyloučeno, že u subpopulace pacientů platí. Stále více autorů však hledá komplexnější mechanismy vedoucí přes poruchy vrozené imunity. V našem případě jde o druhé navrhované vysvětlení b), že bílkoviny z lepku aktivují vrozenou imunitu s autoreaktivitou speciálně proti neuronální transglutamináze, nikoli proti té ve střevním epitelu. V takovém případě by testy na klasickou celiakii vyšly negativně [110].

U osob s autismem a gastrointestinálními příznaky byly detekovány přemnožené Clostridie a chyběly benefiční druhy jako Sutterela, Dorea a Blautia. Abundance Clostridiales pozitivně korelovala hladinou prozánětlivých cytokinů v séru (IL-1, 6, a 17A, IFN-gamma), spojovaných s dysbiózou [74]. To naznačuje možnou roli dysbiózou způsobeného zánětu v patogenezi autismu. Zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů zjistila i studie [111].



Obr. 9: Procentuální rozdíl v hladině cytokinů v séru pacientů s vysokofunkčním autismem ( $n = 28$ ) ve srovnání se zdravými kontrolami ( $n = 28$ ). 100%, červená čára = průměrná hladina u kontrolních subjektů. Všechny subjekty byly v době měření bez medikace. Graf naznačuje roli patologické aktivace imunitního systému v autismu. Upraveno dle [111].

Studie 50 dívek s Rettovým syndromem odhalila stav chronického zánětu střev (zvýšený calprotektin, sedimentace), a dysbiózu spojenou se sníženou diverzitou mikrobiomu a mykobiomu, zvýšeným počtem Actinobakterií, Bifidobacterií (dvojnásobně oproti kontrolám), kvasinek rodu Candida a Firmicutes a sníženým výskytem Bacteroidetes. Ve vzorcích stolice byly také zvýšené mastné kyseliny s krátkým řetězcem (propionát, isovalerát a isobutykrát). To vše nezávisle na výskytu a tíži zácpy [67].

#### 5.4. Dysbióza, aktivace imunitního systému a oxidativní stres

Jeden z mechanismů, jak může chronický zánět přispívat k poškození mozku je zvýšený oxidativní stres. Oxidativní stres je stav, kdy dochází ke zvýšené oxidaci kyslíkovými radikály a/nebo je snížena schopnost organismu tyto radikály odstraňovat.

Antioxidační kapacitu může vyčerpávat mimo jiné jakýkoli zánět v organismu, včetně mírného chronického zánětu střevní sliznice při dysbióze. Mozek je na nedostatek antioxidantů citlivý, neboť má velkou spotřebu kyslíku (tedy i produkci radikálů, které je nutno odstraňovat) a navíc jsou lipidové membrány dobrým substrátem pro oxidaci.

Snížená antioxidační kapacita a oxidativní poškození je typické kromě autismu [60], [61], [69] i pro depresi [14] nebo schizofrenii [15]. Volné radikály a oxidativní stres poškozují membrány, narušují membránový transport a strukturu esenciální pro přenos nervových vzruchů v CNS, narušují energetický metabolismus mitochondrií a podporují zánětlivé stavy.

Studie krevních vzorků 50 pacientů s depresí a 50 zdravých dobrovolníků ukázala u depresivních pacientů téměř trojnásobné zvýšení malondialdehydu a dvojnásobné snížení superoxid dismutázy, jednoho z hlavních antioxidačních enzymů odstraňujících z krve volné radikály. Obě hodnoty navíc korelovaly s mírou depresivity zjištěnou standardními psychotesty [14]. Jiné studie odhalily korelaci mezi gastrointestinálními problémy, narušeným mikrobiomem a depresí [70], [73], [112].

Skupina 30 pacientů se schizofrenií měla v porovnání s 30 zdravými dobrovolníky signifikantně sníženou celkovou antioxidační kapacitu v krevní plasmě a zvýšenou hladinu produktů lipidové peroxidace [15]. To naznačuje poškození membrán oxidačním stresem, a dysfunkce membrán na synapsích neuronů je možným patofyziologickým vysvětlením schizofrenie. Jiné studie ukázaly signifikantní odchylky v mikrobiomu a vyšší pravděpodobnost syndromu dráždivého tračníku u pacientů se schizofrenií [37], [86].

Je pravděpodobné, že zvýšené markery zánětu a známky oxidativního stresu u psychiatrických pacientů jsou přinejmenším u části pacientů spojené s dysbiózou střevního mikrobiomu.

#### 5.5. Osa hypotalamus – hypofýza – nadledvinky a její změny u dysbiózy

Osa hypotalamus – hypofýza – nadledvinky (HPA) je souborem složitých procesů zajišťujících odpověď organismu na stres. Ovlivňuje emoce, potravní a sexuální chování, imunitu. Její dysregulace vede k mnoha onemocněním, včetně psychiatrických [113], [114]. Je propojena s limbickým systémem, což je evolučně velmi stará struktura lidského mozku, která má na svědomí emoční prožívání a paměť. Bakteriální produkty pronikající přes propustnější střevní stěnu mohou interferovat s hormonální regulací této osy. Její aktivaci do značné míry reguluje také nervus vagus, který má receptory pro bakteriální produkty ve střevě.

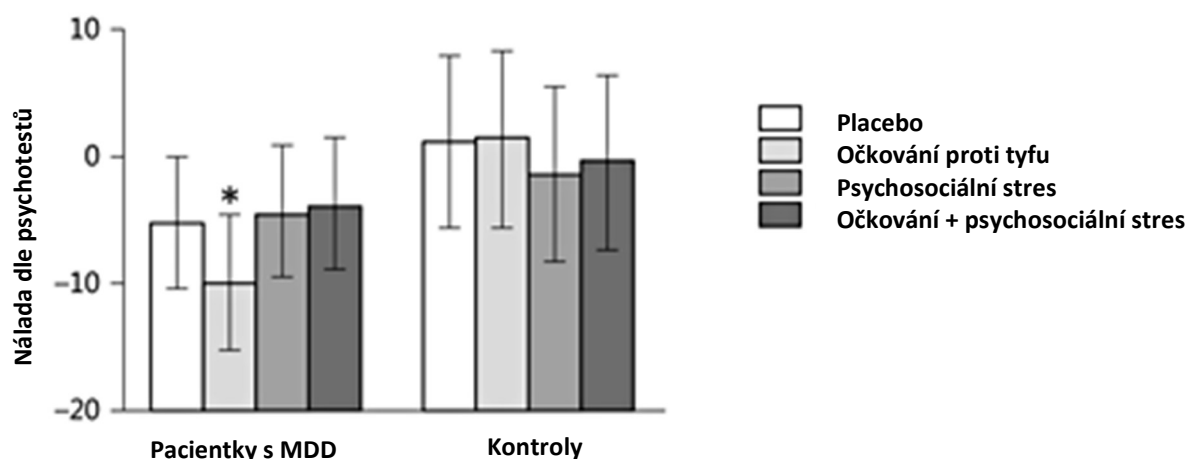
Opakované vystavení organismu potkanů zvýšeným dávkám bakteriálního LPS způsobilo aktivaci imunitního systému (tkáňové cytokiny) a HPA osy, včetně neuronálních změn. Bakteriální LPS se do krve běžně dostává v závislosti na propustnosti střev.

U potkanů došlo k snížení tělesné hmotnosti, zvýšení hmotnosti nadledvinek, a ke změnám v genové expresi v podvěsku mozkovém. Zvýšila se hladina adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a kortizolu v krevní plasmě, při opakovaném podání LPS však výsledky nebyly už tak významné [115].



Mikrobiom trávicího traktu ovlivňuje stresovou reakci přes energetický metabolismus [116], stimulaci vagu a změnami v syntéze prekurzorů neurotransmiterů. HPA osa zpětně zásadně ovlivňuje mikrobiom přes autonomní nervstvo, změny motility střev a vylučováním stresových hormonů měnících vlastnosti střevní sliznice.

Pacientky, které proděly epizodu velké deprese (MDD) reagovaly na zvýšení zánětlivých markerů po očkování poklesem nálady (sickness behavior) více, než ženy bez historie deprese. Ty naopak reagovaly aktivací HPA osy. Na psychologický stres a placebo reagovaly obě skupiny překvapivě podobně. Ukázalo se tedy, že u vulnerabilních jedinců vede ke zvýšení depresivity aktivace imunitního systému výrazněji než psychologický stres [113].



Obr.10: Nálada pacientek s MDD v remisi a kontrol po aplikaci placebo, očkování, psychosociálního stresu a kombinace očkování a psychosociálního stresu. Čím vyšší hodnota, tím méně byly probandky depresivní. Upraveno dle [113].

Narušení reakce HPA osy na zánět může být jedním z rizikových faktorů rozvoje deprese v reakci na dysbiózu. Chronické zvýšení zánětlivých markerů a zároveň dysbióza byly opakovně zjištěny u pacientů s MDD. Dysbióza může aktivací imunitního systému přispívat u vulnerabilních jedinců k depresi, podobně jako jiná zánětlivá onemocnění [112].

## 5.6. Nervus vagus, vagová signalizace a retrogradní transport

Vagová signalizace ovlivňuje aktivitu neuronů a genovou expresi v mozku. Studie na potkanech ukázala rozsáhlé změny v amygdale a hipokampu, strukturách zásadních pro emoce a paměť, po elektrostimulaci vagu. Stimulace ovlivnila frekvenci signalizace různých typů neuronů a snížila vulnerabilitu k experimentálně indukovaným epileptickým záchvatům. Zároveň ovlivnila expresi 22 proteinů, zejména proteinů modulujících funkci excitatorní synapse v závislosti na její aktivitě. Týdenní stimulace způsobila signifikantní zvýšení exprese neurexinu-1 $\alpha$  a cadherinu 13, jejichž mutace spojovány s autismem, a napěťově ovládaných kanálů, které jsou cílem antiepileptických léků. Míra odpovědi závisela na intenzitě stimulace [117].

Nervus vagus je přímou spojnici mezi střevem a mozkem. Bohatě inervuje střevní sliznici a má receptory pro mastné kyseliny s krátkým řetězcem i pro další produkty střeva. *Lactobacillus Rhamnosus*, také přezdívaný psychoaktivní bakterie, prokázal pozitivní účinek při eliminaci úzkosti a léčbě deprese u lidí [99], pozitivní efekt měl také u myších modelů, ale jen pokud měly intaktní nervus vagus [118]. Experiment na myších prokázal změny ve frekvenci akčních potenciálů vysílaných vagem do mozku po

injekci *L. Rhamnosus* do střevního lumen. Změny ve frekvenci a chování myší nebylo možné vysvětlit masivnějším únikem *Lactobacilů* nebo jejich produktů mimo střevní lumen [119].

Vagus poměrně přesně informuje mozek o přítomnosti významných druhů ve střevě. Dle některých autorů má schopnost transportovat neuroaktivní látky přímo ze střeva a obejít tak bariéru mezi střevem a krevním oběhem a hematoencefalickou bariéru [11].

Vagová signalizace, ovlivnitelná produkty střevní mikroflóry, zjevně dokáže měnit genovou expresi v amygdale a hipokampu a aktivitu neuronů, včetně modulace excitatorních synapsí, které hrají roli u autismu, epilepsie nebo deprese. Jelikož nervus vagus do amygdaly nevede, působí pravděpodobně přes aktivaci locus coelorum. Produkty *L. rhamnosus* ve střevě mohou přes receptory aktivovat nervus vagus podobně, jako terapeutická elektrostimulace využívaná k léčbě farmakorezistentní epilepsie a deprese.

## 5.7. Výživa a mikrobiom

U deficiencí esenciálních látek v krvi lidí s psychiatrickými syndromy je těžké určit, nakolik je deficit způsobený dysbiózou, zhoršeným vstřebáváním živin respektive vyčerpáním antioxidační kapacity chronickým zánětem, a nakolik je naopak dysbióza, zánětlivý stav či přímé poškození mozku způsobené výživovou nedostatečností. Jedná se pravděpodobně o začarovaný kruh.

V některých studiích se prokázal snížený obsah vitamínu D [120], [121], B12 [122], mědi [123], selenu [114], zinku [123], [124], antioxidantů [60] a nenasycených mastných kyselin [59], [60] v krvi pacientů s neuropsychiatrickými poruchami. Deficience některé z esenciálních živin může negativně ovlivnit fungování imunitního systému, zejména podpořit rozvoj prozánětlivého prostředí. To pak vede k pozměněným reakcím na mikrobiom a možnosti rozvoje dysbiózy. Ta dále zvyšuje prozánětlivé procesy v těle, zhoršuje autoimunitní onemocnění nebo zánětlivé procesy v mozku.

Včasná suplementace vysokými dávkami vitamínu D3 zlepšila jádrové symptomy autismu, včetně schopnosti sociální interakce a komunikace, během dvou měsíců u případu 32-měsíčního chlapce s autismem a nízkou hladinou vitamínu D3 v krvi [121].

Deficit vitamínu D je jednou z nejčastějších výživových nedostatečností v běžné populaci a trpí jí 57,3% německé dospělé populace [120]. Měření hladiny 25(hydroxy) vitamínu D u 60 dospělých pacientů se schizofrenií a 23 vysokofunkčních autistů ukázala deficienci v 80 a v 78% pacientů. Těžkou deficiencí (<10ng/ml) trpělo 38,3% schizofreniků a 52,2% autistů, ale jen 16,3% z rozsáhlé kontrolní skupiny. Deficienci nebylo možné plně vysvětlit užívanými léky [120]. Vitamín D má řadu důležitých rolí v organismu: reguluje geny opravující DNA, zvyšuje hladinu antioxidačního glutathionu, má protizánětlivé účinky a je prevencí autoimunitních onemocnění (autoprotilátky se opakovaně nacházejí u lidí s autismem i psychiatrickými poruchami), nepřímo také ovlivňuje hladinu oxytocinu a serotoninu (interaguje s jejich metabolity). Autoři studie [120] navrhují možný mechanismus, kdy, deficience vitamínu D v dětství může přispět ke strukturálním abnormalitám vývoje mozku, zatímco v dospělosti vede k narušení funkce imunitního systému ve prospěch zánětlivých procesů.

Deficience vitamínu D je příkladem situace, kdy nedostatek esenciálních živin může být příčinou i následkem dysbiózy. Nedostatek tohoto vitamínu přispívá dle studie z roku 2016 z USA k dysbalanci mezi komenzálními taxony lidského mikrobiomu. Ta má za následek pokles produkce vitamínu B ve střevě, což narušuje funkci imunitního systému ve prospěch vzniku a udržování zánětu. Narušený imunitní systém udržuje dysbiózu a zároveň může dojít k rozvoji autoimunitních chorob. Suplementace vitamínem D přinesla statisticky významné zlepšení stavu 1000 pacientů a přispěla

k zvýšení abundance komenzálních taxonů Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes a Proteobacteria [13].

Jednou z nejčastějších deficiencí u dětí s narušeným vývojem mozku je deficit nenasycených MK, speciálně omega 3. Nedostatek omega 3 mastných kyselin a snížení poměru omega 3/omega 6 zvyšuje riziko zánětlivých procesů v organismu. Analýzy vzorků krevního séra 100 dětí s autismem a 100 zdravých dětí ukázaly, že 54% autistických dětí mělo zvýšený poměr omega6/omega3 NMK [60]. Děti s autismem a zároveň gastrointestinálními problémy měly nižší hladinu DHA a karnitinu než autisté bez GIT potíží a než kontroly.

V roce 2006 vyšla studie, kde děti krmené umělým mlékem bez přídavku NMK měly, dle dotazníkového šetření v rodinách 861 dětí s autismem a 123 kontrol, signifikantně větší pravděpodobnost autismu než děti kojené či krmené mlékem obohaceným o DHA a AA [125]. Polynenasycené MK v mateřském mléce mají pozitivní vliv také na duševní výkonnost v pozdějším věku. 71 dětem byla po 4 měsíce podávána kojenecká výživa obohacená o polynenasycené mastné kyseliny, 76 dětem běžná kojenecká výživa a 88 dětí bylo kojeno. Mezi těmito skupinami nebyl v 6 letech rozdíl v IQ testech ani testech pozornosti, děti s obohacenou výživou však měly v některých testech signifikantně kratší reakční dobu a rychleji zpracovávaly informace [126]. Deficit polynenasycených MK se často vyskytuje u dětí s autismem [48], [49], [50], který sám o sobě není poruchou inteligence, nýbrž rychlosti integrace a zpracování smyslových informací. Studie zdravých dětí potvrzuje do určité míry trend, který známe z neuropatologie. Lze spekulovat, že i u zdravých dětí, které během vývoje měly méně NMK, došlo k určitému oslabení dlouhých a výrazně myelinizovaných axonů zajišťujících rychlou integraci informací, avšak míra narušení nepřekročila diagnostickou hranici poruchy.

## 6. Diskuze

### 6.1. Rozpory ve výsledcích jednotlivých studií

Je nutné zmínit širokou variabilitu výsledků, a to i v rámci výzkumů jednoho onemocnění. Některé články popisují senzační objevy dysbiotických změn a druhových shiftů, jiné, zkoumající stejnou chorobu, nacházejí změny stěží statisticky detekovatelné, a ještě jiné popisují shifty naprosto protichůdné. Důvody mohou být různé. Duševní onemocnění jsou většinou multietiologická, vznikají kombinací různých faktorů v kontextu života jednotlivce a stejný projev chování může být způsoben mnoha různými příčinami, ať už genetickými, metabolickými, imunologickými atd.. Stejně tak mohou být projevy nemoci mnoha faktory maskovány (například naučené přizpůsobení zdánlivě „lehčích“ autistů, tréninkem zlepšené výsledky v testech IQ a dovedností, psychoterapií zmírněná nebo životními okolnostmi komplikovaná porucha nálady...). Duševní nemoci jsou většinou diagnostikovány pouze na základě chování pacienta, nikoli pomocí přesných biomarkerů.

Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny nevhodnou volbou kontrolních subjektů, například při zkoumání mikrobiomu rodinných příslušníků jako kontrol [83]. Například u autismu studie prokázala, že mikrobiom zdravých sourozenců leží někde mezi běžnou populací a postiženým sourozencem [72]. Nevhodnou kontrolou mohou být také jiné patientské skupiny – jednak kvůli možné kontaminaci mikrobiomu v nemocničním prostředí, jednak proto, že pacienti s jinou diagnózou mohou dysbiózou trpět také.

Volba samotných probandů by měla být také prováděna uvážlivě, zejména v případě jejich malého počtu. Většina sekvenačních studií mikrobiomu autistů operuje s počtem probandů menším než 100, mnohdy i menším než 10, a obvykle ze stejné geografické oblasti. Nelze tedy vyloučit, že

v jiných oblastech, zemích, kulturách s jinými dietními a hygienickými návyky, se může dysbióza na úrovni mikrobiomu manifestovat jinak. Pokud se tedy v dané studii sejde heterogenní skupina dysbiotických pacientů, statistická analýza zastoupených taxonů neodhalí žádný trend. Zajímavé by bylo studovat interindividuální variabilitu a srovnat ji s variabilitou v běžné populaci, ale i zde by bylo zapotřebí co největší počet testovaných subjektů. Pokud se sejde skupina více-méně homogenní, je trend k převaze některých taxonů odhalen, v jiné skupině se ale může objevit jiný trend a vše se zdá pohybovat v kruhu. Je zjevné, že dysbióza není problémem jednomu druhu, ale spíše měnícím se trendem ve výskytu prospěšných a méně prospěšných druhů s jejich složitými a v každém vzorku jedinečnými vztahy.

Pro úplnost výčtu problémů při chápání taxonomických analýz je nutné připomenout, že vzorky stolice, jimiž se většina studií zabývá, nemusí zobrazovat reálné zastoupení druhů ve střevě. Existují například mucinofilní bakterie, mutualisté a možná i patogeni, kteří se do exkrementů dostávají jen minimálně a k jejich zkoumání je zapotřebí invazivních metod.

## **6.2. Antibiotika nemusí narušovat jen střevní mikrobiom**

Velká část této práce se opírá o fakt, že užívání antibiotik má negativní vliv na střevní mikroflóru. Spojení duševních poruch a užívání antibiotik jsem, podobně jako další autoři, používala k podpoře teorie o významu mikrobiomu v patogenezi těchto poruch. Se zajímavou hypotézou přichází G.B. Stefano ve svém review [127]. Vzhledem k evoluční podobnosti bakterií a mitochondrií mohou některá antibiotika přímo poškozovat mitochondrie. Mitochondriální poškození bylo zjištěno u autismu, schizofrenie i dalších poruch. To by znamenalo, že určitý subtyp poruch CNS s exacerbací po podávání antibiotik možná s mikrobiomem nesouvisí. Při hledání podpůrných argumentů pro (i bez nich poměrně robustní) roli mikrobiomu v regulaci CNS je třeba zachovávat při interpretaci dat obezřetnost.

## **6.3. Další organismy ve střevě a další onemocnění**

Zajímavé publikace (např. [108]) existují na téma střevních kvasinek, prvoků nebo mnohobuněčných parazitů v patogenezi dysbióz. Ačkoli nepovažují bakterie za jediné původce střevní dysbalance, rozsah práce neumožnil větší rozšíření mimo bakteriální sféru. Totéž platí i pro dysproporci v obsahu práce ve prospěch autismu oproti jiným manifestacím poškození CNS. Existují důkazy souvislosti mikrobiomu téměř s každou duševní poruchou, rozsah práce však neumožňuje vypsát specifika jednotlivých patientských skupin, metodologií a oproti neurovývojovým poruchám naprosto odlišných mikrobiologických nálezů. Kde to však bylo možné, pokusila jsem se zmínit uplatnění popisovaného mechanismu i u dalších diagnóz.

## **6.4. Závěrem: Je autismus plně vysvětlitelný narušením mikrobiomu?**

Existuje sice řada publikací zabývajících se mikrobiomem a autismem, nicméně je nezbytné poznatky v nich utřídit a zorientovat se v nich, což považuji za přínos této bakalářské práce. Vytvořila jsem přehled důležitých poznatků, které jsou o mikrobiomu u autismu již známy, a nastínila otázky, které je potřeba řešit. Tytéž mechanismy jako u autismu, pokud působí v jiném než nejranějším období života a na jiném genetickém pozadí, lze zkoumat (a jsou zkoumány) coby možné příčiny mnoha dalších duševních poruch.

Autismus nepovažují popsáním mikrobiálních změn za vyčerpané téma. U tak komplexního onemocnění je nasnadě zapojení mnoha orgánových systémů do patogeneze. Cenné výzkumy byly provedeny na poli genetiky, neurofyzilogie a vývojové biologie. Studium mikrobiomu je jedním ze střípků, které mohou k pochopení této multietilogické poruchy, či spíše souboru poruch, přispět. Mikrobiologický přístup může být sám o sobě dostačující odpovědí u subpopulace autistických pacientů, u nichž terapeutické postupy jako dieta, FMT nebo probiotika přinesly své ovoce. Nelze však říct, že všechny případy autismu souvisejí s mikrobiomem stejnou měrou, a že všechny jsou přes něj terapeuticky ovlivnitelné. K rozpoznání etiologických subtypů autismu povede ještě dlouhá cesta, jejíž základy v mnoha biomedicínských oborech byly již položeny.

## Zdroje

- [1] D.-W. Kang *et al.*, „Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study", *Microbiome*, roč. 5, č. 1, s. 10, led. 2017.
- [2] M. De Angelis *et al.*, „Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified", *PloS One*, roč. 8, č. 10, s. e76993, 2013.
- [3] C. De Filippo *et al.*, „Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 107, č. 33, s. 14691–14696, srp. 2010.
- [4] P. M. Smith *et al.*, „The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis", *Science*, roč. 341, č. 6145, s. 569–573, srp. 2013.
- [5] E. Emanuele *et al.*, „Low-grade endotoxemia in patients with severe autism", *Neurosci. Lett.*, roč. 471, č. 3, s. 162–165, bre. 2010.
- [6] M. Fiorentino *et al.*, „Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders", *Mol. Autism*, roč. 7, s. 49, 2016.
- [7] W. Shaw, „Increased urinary excretion of a 3-(3-hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid (HPHPA), an abnormal phenylalanine metabolite of *Clostridia* spp. in the gastrointestinal tract, in urine samples from patients with autism and schizophrenia", *Nutr. Neurosci.*, roč. 13, č. 3, s. 135–143, čer. 2010.
- [8] E. R. Bolte, „Autism and *Clostridium tetani*", *Med. Hypotheses*, roč. 51, č. 2, s. 133–144, srp. 1998.
- [9] A. Schulfer a M. J. Blaser, „Risks of Antibiotic Exposures Early in Life on the Developing Microbiome", *PLoS Pathog.*, roč. 11, č. 7, s. e1004903, čvc. 2015.
- [10] S. M. Finegold *et al.*, „Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism", *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, roč. 35, č. Suppl 1, s. S6–S16, zář. 2002.
- [11] B. Hensel, U. C. Seib, a H. H. Wellhöner, „Vagal ascent and distribution of 125 I-tetanus toxin after injection into the anterior wall of the stomach", *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, roč. 276, č. 3–4, s. 395–402, 1973.
- [12] K. A. Manning, J. T. Erichsen, a C. Evinger, „Retrograde transneuronal transport properties of fragment C of tetanus toxin", *Neuroscience*, roč. 34, č. 1, s. 251–263, 1990.
- [13] S. C. Gominak, „Vitamin D deficiency changes the intestinal microbiome reducing B vitamin production in the gut. The resulting lack of pantothenic acid adversely affects the immune system, producing a ‚pro-inflammatory‘ state associated with atherosclerosis and autoimmunity", *Med. Hypotheses*, roč. 94, s. 103–107, zář. 2016.
- [14] M. A. Camkurt, E. Findikli, F. İzci, E. B. Kurutaş, a T. C. Tuman, „Evaluation of malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase activity and their diagnostic value in drug naïve, first episode, non-smoker major depression patients and healthy controls", *Psychiatry Res.*, roč. 238, s. 81–85, dub. 2016.
- [15] A. Dietrich-Muszalska a B. Kontek, „Lipid peroxidation in patients with schizophrenia", *Psychiatry Clin. Neurosci.*, roč. 64, č. 5, s. 469–475, říj. 2010.
- [16] L. Ciccoli *et al.*, „Erythrocyte shape abnormalities, membrane oxidative damage, and  $\beta$ -actin alterations: an unrecognized triad in classical autism", *Mediators Inflamm.*, roč. 2013, s. 432616, 2013.

- [17] E. Grasset *et al.*, „A Specific Gut Microbiota Dysbiosis of Type 2 Diabetic Mice Induces GLP-1 Resistance through an Enteric NO-Dependent and Gut-Brain Axis Mechanism", *Cell Metab.*, roč. 25, č. 5, s. 1075–1090.e5, kvě. 2017.
- [18] T. Sen *et al.*, „Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity", *Physiol. Behav.*, roč. 173, s. 305–317, kvě. 2017.
- [19] R. A. Yunes *et al.*, „GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota", *Anaerobe*, roč. 42, s. 197–204, pro. 2016.
- [20] S. M. Finegold, P. H. Summanen, J. Downes, K. Corbett, a T. Komoriya, „Detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in the gut microbiota of autistic children", *Anaerobe*, úno. 2017.
- [21] P. M. Stanaszek, J. F. Snell, a J. J. O'Neill, „Isolation, extraction, and measurement of acetylcholine from *Lactobacillus plantarum*", *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 34, č. 2, s. 237–239, srp. 1977.
- [22] R. L. Hansen *et al.*, „Regression in autism: prevalence and associated factors in the CHARGE Study", *Ambul. Pediatr. Off. J. Ambul. Pediatr. Assoc.*, roč. 8, č. 1, s. 25–31, úno. 2008.
- [23] R. H. Sandler *et al.*, „Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism", *J. Child Neurol.*, roč. 15, č. 7, s. 429–435, čvc. 2000.
- [24] N. Andrews, E. Miller, A. Grant, J. Stowe, V. Osborne, a B. Taylor, „Thimerosal exposure in infants and developmental disorders: a retrospective cohort study in the United kingdom does not support a causal association", *Pediatrics*, roč. 114, č. 3, s. 584–591, zář. 2004.
- [25] Y. Uno, T. Uchiyama, M. Kurosawa, B. Aleksic, a N. Ozaki, „Early exposure to the combined measles-mumps-rubella vaccine and thimerosal-containing vaccines and risk of autism spectrum disorder", *Vaccine*, roč. 33, č. 21, s. 2511–2516, kvě. 2015.
- [26] B. H. K. Yip *et al.*, „Caesarean section and risk of autism across gestational age: a multi-national cohort study of 5 million births", *Int. J. Epidemiol.*, pro. 2016.
- [27] L. de Magistris *et al.*, „Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, roč. 51, č. 4, s. 418–424, říj. 2010.
- [28] J. B. Adams, L. J. Johansen, L. D. Powell, D. Quig, a R. A. Rubin, „Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity", *BMC Gastroenterol.*, roč. 11, s. 22, bře. 2011.
- [29] S. H. Ibrahim, R. G. Voigt, S. K. Katusic, A. L. Weaver, a W. J. Barbaresi, „Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study", *Pediatrics*, roč. 124, č. 2, s. 680–686, srp. 2009.
- [30] D. L. Coury *et al.*, „Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda", *Pediatrics*, roč. 130 Suppl 2, s. S160-168, lis. 2012.
- [31] A. B. Brandwein *et al.*, „The development of multisensory integration in high-functioning autism: high-density electrical mapping and psychophysical measures reveal impairments in the processing of audiovisual inputs", *Cereb. Cortex N. Y. N 1991*, roč. 23, č. 6, s. 1329–1341, čer. 2013.
- [32] J. S. Nomi a L. Q. Uddin, „Developmental changes in large-scale network connectivity in autism", *NeuroImage Clin.*, roč. 7, s. 732–741, 2015.

- [33] B. Zikopoulos a H. Barbas, „Changes in prefrontal axons may disrupt the network in autism", *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, roč. 30, č. 44, s. 14595–14609, lis. 2010.
- [34] R. H. Yolken *et al.*, „Metagenomic Sequencing Indicates That the Oropharyngeal Phageome of Individuals With Schizophrenia Differs From That of Controls", *Schizophr. Bull.*, roč. 41, č. 5, s. 1153–1161, zář. 2015.
- [35] U. C. Ghoshal, R. Shukla, a U. Ghoshal, „Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Irritable Bowel Syndrome: A Bridge between Functional Organic Dichotomy", *Gut Liver*, roč. 11, č. 2, s. 196–208, bře. 2017.
- [36] K. Hod *et al.*, „A double-blind, placebo-controlled study to assess the effect of a probiotic mixture on symptoms and inflammatory markers in women with diarrhea-predominant IBS", *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.*, bře. 2017.
- [37] S. Gupta, P. S. Masand, D. Kaplan, A. Bhandary, a S. Hendricks, „The relationship between schizophrenia and irritable bowel syndrome (IBS)", *Schizophr. Res.*, roč. 23, č. 3, s. 265–268, úno. 1997.
- [38] L. Desbonnet, G. Clarke, F. Shanahan, T. G. Dinan, a J. F. Cryan, „Microbiota is essential for social development in the mouse", *Mol. Psychiatry*, roč. 19, č. 2, s. 146–148, úno. 2014.
- [39] L. Wang, C. T. Christophersen, M. J. Sorich, J. P. Gerber, M. T. Anglely, a M. A. Conlon, „Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism", *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 77, č. 18, s. 6718–6721, zář. 2011.
- [40] J. Li, S. Lin, P. M. Vanhoutte, C. W. Woo, a A. Xu, „*Akkermansia Muciniphila* Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in Apoe<sup>-/-</sup> Mice", *Circulation*, roč. 133, č. 24, s. 2434–2446, čer. 2016.
- [41] S. Zhao *et al.*, „*Akkermansia muciniphila* improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice", *J. Mol. Endocrinol.*, roč. 58, č. 1, s. 1–14, led. 2017.
- [42] T. Maekawa *et al.*, „*Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis", *Cell Host Microbe*, roč. 15, č. 6, s. 768–778, čer. 2014.
- [43] Y.-H. Hsieh *et al.*, „Impact of Different Fecal Processing Methods on Assessments of Bacterial Diversity in the Human Intestine", *Front. Microbiol.*, roč. 7, s. 1643, 2016.
- [44] J. M. Auchtung, C. D. Robinson, a R. A. Britton, „Cultivation of stable, reproducible microbial communities from different fecal donors using minibioreactor arrays (MBRAs)", *Microbiome*, roč. 3, s. 42, zář. 2015.
- [45] N. A. Kennedy *et al.*, „The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing", *PloS One*, roč. 9, č. 2, s. e88982, 2014.
- [46] J.-Y. Yang *et al.*, „Enteric Viruses Ameliorate Gut Inflammation via Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7-Mediated Interferon- $\beta$  Production", *Immunity*, roč. 44, č. 4, s. 889–900, dub. 2016.
- [47] N. Müller, M. Riedel, A. Straube, W. Günther, a B. Wilske, „Increased anti-streptococcal antibodies in patients with Tourette's syndrome", *Psychiatry Res.*, roč. 94, č. 1, s. 43–49, dub. 2000.
- [48] R. B. Sartor, „Microbial influences in inflammatory bowel diseases", *Gastroenterology*, roč. 134, č. 2, s. 577–594, úno. 2008.



- [49] A. Tsuruya *et al.*, „Ecophysiological consequences of alcoholism on human gut microbiota: implications for ethanol-related pathogenesis of colon cancer", *Sci. Rep.*, roč. 6, s. 27923, čer. 2016.
- [50] T. Odamaki *et al.*, „Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study", *BMC Microbiol.*, roč. 16, s. 90, kvě. 2016.
- [51] S. Amarri *et al.*, „Changes of gut microbiota and immune markers during the complementary feeding period in healthy breast-fed infants", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, roč. 42, č. 5, s. 488–495, kvě. 2006.
- [52] F. Bäckhed *et al.*, „Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life", *Cell Host Microbe*, roč. 17, č. 6, s. 852, čer. 2015.
- [53] M. Fallani *et al.*, „Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres", *Microbiol. Read. Engl.*, roč. 157, č. Pt 5, s. 1385–1392, kvě. 2011.
- [54] M. Simrén *et al.*, „Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report", *Gut*, roč. 62, č. 1, s. 159–176, led. 2013.
- [55] R. F. Slykerman, J. Thompson, K. E. Waldie, R. Murphy, C. Wall, a E. A. Mitchell, „Antibiotics in the first year of life and subsequent neurocognitive outcomes", *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992*, roč. 106, č. 1, s. 87–94, led. 2017.
- [56] I. Hadjkacem *et al.*, „Prenatal, perinatal and postnatal factors associated with autism spectrum disorder", *J. Pediatr. (Rio J.)*, roč. 92, č. 6, s. 595–601, pro. 2016.
- [57] E. Jašarević, C. L. Howerton, C. D. Howard, a T. L. Bale, „Alterations in the Vaginal Microbiome by Maternal Stress Are Associated With Metabolic Reprogramming of the Offspring Gut and Brain", *Endocrinology*, roč. 156, č. 9, s. 3265–3276, zář. 2015.
- [58] M. Forsgren, E. Isolauri, S. Salminen, a S. Rautava, „Late preterm birth has direct and indirect effects on infant gut microbiota development during the first six months of life", *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992*, bře. 2017.
- [59] R. C. Robertson *et al.*, „Omega-3 polyunsaturated fatty acids critically regulate behaviour and gut microbiota development in adolescence and adulthood", *Brain. Behav. Immun.*, roč. 59, s. 21–37, led. 2017.
- [60] G. A. Mostafa a L. Y. Al-Ayadhi, „Reduced levels of plasma polyunsaturated fatty acids and serum carnitine in autistic children: relation to gastrointestinal manifestations", *Behav. Brain Funct. BBF*, roč. 11, s. 4, úno. 2015.
- [61] S. A. Brigandi, H. Shao, S. Y. Qian, Y. Shen, B.-L. Wu, a J. X. Kang, „Autistic children exhibit decreased levels of essential Fatty acids in red blood cells", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 16, č. 5, s. 10061–10076, kvě. 2015.
- [62] L. Dethlefsen, S. Huse, M. L. Sogin, a D. A. Relman, „The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing", *PLoS Biol.*, roč. 6, č. 11, s. e280, lis. 2008.
- [63] S. F. Clarke *et al.*, „Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity", *Gut*, roč. 63, č. 12, s. 1913–1920, pro. 2014.
- [64] C. Papista *et al.*, „Gluten induces coeliac-like disease in sensitised mice involving IgA, CD71 and transglutaminase 2 interactions that are prevented by probiotics", *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, roč. 92, č. 4, s. 625–635, dub. 2012.
- [65] C. Mittermaier *et al.*, „Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study", *Psychosom. Med.*, roč. 66, č. 1, s. 79–84, úno. 2004.

- [66] W. J. Lukiw, „Bacteroides fragilis Lipopolysaccharide and Inflammatory Signaling in Alzheimer's Disease", *Front. Microbiol.*, roč. 7, s. 1544, 2016.
- [67] F. Strati *et al.*, „Altered gut microbiota in Rett syndrome", *Microbiome*, roč. 4, č. 1, s. 41, čvc. 2016.
- [68] D.-W. Kang *et al.*, „Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children", *PloS One*, roč. 8, č. 7, s. e68322, 2013.
- [69] I. Maezawa a L.-W. Jin, „Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate", *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, roč. 30, č. 15, s. 5346–5356, dub. 2010.
- [70] P. Lin *et al.*, „Prevotella and Klebsiella proportions in fecal microbial communities are potential characteristic parameters for patients with major depressive disorder", *J. Affect. Disord.*, roč. 207, s. 300–304, led. 2017.
- [71] A. Tomova *et al.*, „Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia", *Physiol. Behav.*, roč. 138, s. 179–187, led. 2015.
- [72] S. M. Finegold *et al.*, „Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children", *Anaerobe*, roč. 16, č. 4, s. 444–453, srp. 2010.
- [73] H. Jiang *et al.*, „Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder", *Brain. Behav. Immun.*, roč. 48, s. 186–194, srp. 2015.
- [74] R. A. Luna *et al.*, „Distinct Microbiome-Neuroimmune Signatures Correlate With Functional Abdominal Pain in Children With Autism Spectrum Disorder", *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, roč. 3, č. 2, s. 218–230, bre. 2017.
- [75] H. Sokol *et al.*, „Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 105, č. 43, s. 16731–16736, říj. 2008.
- [76] F. Rowan, N. G. Docherty, M. Murphy, B. Murphy, J. Calvin Coffey, a P. R. O'Connell, „Desulfovibrio bacterial species are increased in ulcerative colitis", *Dis. Colon Rectum*, roč. 53, č. 11, s. 1530–1536, lis. 2010.
- [77] M. Nakajima *et al.*, „Oral Administration of P. gingivalis Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver", *PloS One*, roč. 10, č. 7, s. e0134234, 2015.
- [78] S. M. Finegold, „Desulfovibrio species are potentially important in regressive autism", *Med. Hypotheses*, roč. 77, č. 2, s. 270–274, srp. 2011.
- [79] L. Altieri *et al.*, „Urinary p-cresol is elevated in small children with severe autism spectrum disorder", *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.*, roč. 16, č. 3, s. 252–260, kvě. 2011.
- [80] C. Wang *et al.*, „Intestinal Microbiota Profiles of Healthy Pre-School and School-Age Children and Effects of Probiotic Supplementation", *Ann. Nutr. Metab.*, roč. 67, č. 4, s. 257–266, 2015.
- [81] S. M. Finegold, „Therapy and epidemiology of autism--clostridial spores as key elements", *Med. Hypotheses*, roč. 70, č. 3, s. 508–511, 2008.
- [82] H. M. R. T. Parracho, M. O. Bingham, G. R. Gibson, a A. L. McCartney, „Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children", *J. Med. Microbiol.*, roč. 54, č. Pt 10, s. 987–991, říj. 2005.
- [83] J. S. Son *et al.*, „Comparison of Fecal Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorders and Neurotypical Siblings in the Simons Simplex Collection", *PloS One*, roč. 10, č. 10, s. e0137725, 2015.

- [84] L. Steenbergen, R. Sellaro, S. van Hemert, J. A. Bosch, a L. S. Colzato, „A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood", *Brain. Behav. Immun.*, roč. 48, s. 258–264, srp. 2015.
- [85] M. Moieni, M. R. Irwin, I. Jevtic, E. C. Breen, a N. I. Eisenberger, „Inflammation impairs social cognitive processing: A randomized controlled trial of endotoxin", *Brain. Behav. Immun.*, roč. 48, s. 132–138, srp. 2015.
- [86] E. G. Severance *et al.*, „Discordant patterns of bacterial translocation markers and implications for innate immune imbalances in schizophrenia", *Schizophr. Res.*, roč. 148, č. 1–3, s. 130–137, srp. 2013.
- [87] R. M. Stilling, M. van de Wouw, G. Clarke, C. Stanton, T. G. Dinan, a J. F. Cryan, „The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis?", *Neurochem. Int.*, roč. 99, s. 110–132, říj. 2016.
- [88] J. R. Davie, „Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate", *J. Nutr.*, roč. 133, č. 7 Suppl, s. 2485S–2493S, čvc. 2003.
- [89] H. Gagliano, R. Delgado-Morales, A. Sanz-Garcia, a A. Armario, „High doses of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate trigger a stress-like response", *Neuropharmacology*, roč. 79, s. 75–82, dub. 2014.
- [90] S. R. Shultz *et al.*, „Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism", *Neuropharmacology*, roč. 54, č. 6, s. 901–911, kvě. 2008.
- [91] R. H. Thomas *et al.*, „The enteric bacterial metabolite propionic acid alters brain and plasma phospholipid molecular species: further development of a rodent model of autism spectrum disorders", *J. Neuroinflammation*, roč. 9, s. 153, čvc. 2012.
- [92] D. F. MacFabe, N. E. Cain, F. Boon, K.-P. Ossenkopp, a D. P. Cain, „Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder", *Behav. Brain Res.*, roč. 217, č. 1, s. 47–54, úno. 2011.
- [93] R. H. Thomas, K. A. Foley, J. R. Mephram, L. J. Tichenoff, F. Possmayer, a D. F. MacFabe, „Altered brain phospholipid and acylcarnitine profiles in propionic acid infused rodents: further development of a potential model of autism spectrum disorders", *J. Neurochem.*, roč. 113, č. 2, s. 515–529, dub. 2010.
- [94] L. Wang, C. T. Christophersen, M. J. Sorich, J. P. Gerber, M. T. Angley, a M. A. Conlon, „Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder", *Dig. Dis. Sci.*, roč. 57, č. 8, s. 2096–2102, srp. 2012.
- [95] J. Cai, L. Ding, J.-S. Zhang, J. Xue, a L.-Z. Wang, „Elevated plasma levels of glutamate in children with autism spectrum disorders", *Neuroreport*, roč. 27, č. 4, s. 272–276, bře. 2016.
- [96] A. El-Ansary a L. Al-Ayadhi, „GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders", *J. Neuroinflammation*, roč. 11, s. 189, lis. 2014.
- [97] M. M. Zaki, H. Abdel-Al, a M. Al-Sawi, „Assessment of plasma amino acid profile in autism using cation-exchange chromatography with postcolumn derivatization by ninhydrin", *Turk. J. Med. Sci.*, roč. 47, č. 1, s. 260–267, 27 2017.
- [98] J. O'Neill *et al.*, „Glutamate in Pediatric Obsessive-Compulsive Disorder and Response to Cognitive-Behavioral Therapy: Randomized Clinical Trial", *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, dub. 2017.

- [99] G. Akkasheh *et al.*, „Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif*, roč. 32, č. 3, s. 315–320, bře. 2016.
- [100] L. Desbonnet, L. Garrett, G. Clarke, J. Bienenstock, a T. G. Dinan, „The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat", *J. Psychiatr. Res.*, roč. 43, č. 2, s. 164–174, pro. 2008.
- [101] O. Sokolov *et al.*, „Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity", *Peptides*, roč. 56, s. 68–71, čer. 2014.
- [102] A. M. Persico a V. Napolioni, „Urinary p-cresol in autism spectrum disorder", *Neurotoxicol. Teratol.*, roč. 36, s. 82–90, dub. 2013.
- [103] L. C. Hunter, A. O'Hare, W. J. Herron, L. A. Fisher, a G. E. Jones, „Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism", *Dev. Med. Child Neurol.*, roč. 45, č. 2, s. 121–128, úno. 2003.
- [104] K. L. Reichelt, D. Tveiten, A.-M. Knivsberg, a G. Brønstad, „Peptides' role in autism with emphasis on exorphins", *Microb. Ecol. Health Dis.*, roč. 23, 2012.
- [105] H. Cass *et al.*, „Absence of urinary opioid peptides in children with autism", *Arch. Dis. Child.*, roč. 93, č. 9, s. 745–750, zář. 2008.
- [106] K. Dettmer, D. Hanna, P. Whetstone, R. Hansen, a B. D. Hammock, „Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE-HPLC-tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory", *Anal. Bioanal. Chem.*, roč. 388, č. 8, s. 1643–1651, srp. 2007.
- [107] M. S. Trivedi, N. W. Hodgson, S. J. Walker, G. Trooskens, V. Nair, a R. C. Deth, „Epigenetic effects of casein-derived opioid peptides in SH-SY5Y human neuroblastoma cells", *Nutr. Metab.*, roč. 12, s. 54, 2015.
- [108] M. R. Iovene *et al.*, „Intestinal Dysbiosis and Yeast Isolation in Stool of Subjects with Autism Spectrum Disorders", *Mycopathologia*, roč. 182, č. 3–4, s. 349–363, dub. 2017.
- [109] E. G. Severance *et al.*, „IgG dynamics of dietary antigens point to cerebrospinal fluid barrier or flow dysfunction in first-episode schizophrenia", *Brain. Behav. Immun.*, roč. 44, s. 148–158, úno. 2015.
- [110] E. Lionetti, S. Leonardi, C. Franzonello, M. Mancardi, M. Ruggieri, a C. Catassi, „Gluten Psychosis: Confirmation of a New Clinical Entity", *Nutrients*, roč. 7, č. 7, s. 5532–5539, čvc. 2015.
- [111] K. Suzuki *et al.*, „Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders", *PloS One*, roč. 6, č. 5, s. e20470, 2011.
- [112] T. Canli, „Reconceptualizing major depressive disorder as an infectious disease", *Biol. Mood Anxiety Disord.*, roč. 4, s. 10, 2014.
- [113] P. Niemegeers *et al.*, „Differential Effects of Inflammatory and Psychosocial Stress on Mood, Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, and Inflammation in Remitted Depression", *Neuropsychobiology*, roč. 74, č. 3, s. 150–158, dub. 2017.
- [114] G. Delvecchio, A. C. Altamura, J. C. Soares, a P. Brambilla, „Pituitary gland in Bipolar Disorder and Major Depression: Evidence from structural MRI studies", *J. Affect. Disord.*, dub. 2017.
- [115] V. Grinevich, X. M. Ma, J. P. Herman, D. Jezova, I. Akmayev, a G. Aguilera, „Effect of repeated lipopolysaccharide administration on tissue cytokine expression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in rats", *J. Neuroendocrinol.*, roč. 13, č. 8, s. 711–723, srp. 2001.

- [116] A. Ait-Belgnaoui *et al.*, „Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats", *Psychoneuroendocrinology*, roč. 37, č. 11, s. 1885–1895, lis. 2012.
- [117] G. M. Alexander, Y. Z. Huang, E. J. Soderblom, X.-P. He, M. A. Moseley, a J. O. McNamara, „Vagal nerve stimulation modifies neuronal activity and the proteome of excitatory synapses of amygdala/piriform cortex", *J. Neurochem.*, roč. 140, č. 4, s. 629–644, úno. 2017.
- [118] J. A. Bravo *et al.*, „Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 108, č. 38, s. 16050–16055, zář. 2011.
- [119] A. Perez-Burgos *et al.*, „Psychoactive bacteria Lactobacillus rhamnosus (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, roč. 304, č. 2, s. G211–220, led. 2013.
- [120] D. Endres *et al.*, „Vitamin D Deficiency in Adult Patients with Schizophreniform and Autism Spectrum Syndromes: A One-Year Cohort Study at a German Tertiary Care Hospital", *Front. Psychiatry*, roč. 7, s. 168, 2016.
- [121] F. Jia, B. Wang, L. Shan, Z. Xu, W. G. Staal, a L. Du, „Core symptoms of autism improved after vitamin D supplementation", *Pediatrics*, roč. 135, č. 1, s. e196–198, led. 2015.
- [122] J. L. Roffman *et al.*, „Randomized multicenter investigation of folate plus vitamin B12 supplementation in schizophrenia", *JAMA Psychiatry*, roč. 70, č. 5, s. 481–489, kvě. 2013.
- [123] B. Vidović *et al.*, „Selenium, zinc, and copper plasma levels in patients with schizophrenia: relationship with metabolic risk factors", *Biol. Trace Elem. Res.*, roč. 156, č. 1–3, s. 22–28, pro. 2013.
- [124] S. Pfaender *et al.*, „Zinc deficiency and low enterocyte zinc transporter expression in human patients with autism related mutations in SHANK3", *Sci. Rep.*, roč. 7, s. 45190, bře. 2017.
- [125] S. T. Schultz *et al.*, „Breastfeeding, infant formula supplementation, and Autistic Disorder: the results of a parent survey", *Int. Breastfeed. J.*, roč. 1, s. 16, zář. 2006.
- [126] P. Willatts, S. Forsyth, C. Agostoni, P. Casaer, E. Riva, a G. Boehm, „Effects of long-chain PUFA supplementation in infant formula on cognitive function in later childhood", *Am. J. Clin. Nutr.*, roč. 98, č. 2, s. 536S–42S, srp. 2013.
- [127] G. B. Stefano, J. Samuel, a R. M. Kream, „Antibiotics May Trigger Mitochondrial Dysfunction Inducing Psychiatric Disorders", *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, roč. 23, s. 101–106, led. 2017.